

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von
spinozellulären Karzinomen der Haut**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Doreen Jäger

aus
Hohenmölsen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Rudolf A. Rupec

Mitberichtersteller: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Gires
Prof. Dr. rer. nat. Helga Schmetzer
Priv. Doz. Dr. med. Christoph Walz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2014

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	6
1.1.1	Was versteht man unter dem NF- κ B Transkriptionsfaktor	6
1.1.2	Die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade	7
1.1.3	Aufbau der Haut und welche Rolle spielt NF- κ B, sowohl physiologisch, als auch pathophysiologisch	12
1.1.4	Aufbau des Dickdarms und welche Rolle spielt NF- κ B, sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch	13
1.2	Die Relevanz des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Karzinogenese.....	15
1.3	Tumorentstehung	17
1.3.1	Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese.....	17
1.3.2	Welche Funktionen haben DMBA und TPA/PMA bei der Einwirkung auf die Haut der Maus?	22
1.3.2.1	DMBA - ein Tumorigen	22
1.3.2.2	TPA/PMA - ein Tumorigen und seine Auswirkungen	23
1.4	Das spinözelluläre Karzinom	27
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.2	Antikörper	32
2.3	Für die Versuchsreihen verwendete Mausstämme.....	33
2.4	Zucht der Mäuse.....	33
2.5	PCR als Methode zur Genotypisierung der Mäuse	33
2.6	Trennung von Keratinozyten und Fibroblasten	37
2.7	Protokolle für die Durchführung der Versuchsreihen	38
2.7.1	Protokoll 1/2.....	38
2.8	Histologische und immunhistochemische Verfahren	39
2.8.1	Herstellung von Paraffinschnitten	39
2.8.2	HE-Färbungen	40
2.8.3	AEC-Färbung.....	41
2.8.3.1	Puffer und Lösungen	41
2.8.3.2	Protokoll Färbemethode	42

3	Ergebnisse	44
3.1.1	Beobachtungen und Auswertung der Versuchsreihen A-C	45
3.2	Beobachtungen und Auswertung der Versuchsreihen X 1- 4	57
3.2.1.3	Vergleich Versuchsreihen X 1 ₁ / X 3 ₁ und X1 ₂ / X 3 ₂	61
3.3.1	Auswertung bei TPA-Applikation zweimal pro Woche	68
3.3.2	Auswertung bei TPA-Applikation dreimal pro Woche mit erhöhter Konzentration	72
3.4	Auswertung der histochemischen Färbungen	81
3.4.1	Färbungen mit Antikörper NF- κ B p65 (A) : sc-109	81
3.4.2	Färbungen mit Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser276).....	86
3.4.3	Färbungen mit Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Thr435).....	89
3.4.4	Färbungen mit Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser468).....	91
3.4.5	Färbungen mit Antikörper IKK α/β (H-470): sc-7607	93
3.4.6	Färbungen mit Antikörper Phospho-IKK α/β (Ser176/180)	98
3.4.6.1	Vergleich immunhistochemischer Färbungen mit Antikörper Phospho-IKK α/β (Ser176/180) und Phospho-NF- κ B-p65 (Ser276)	100
3.4.7	Färbungen mit Antikörper c-Jun (H-79): sc-1694.....	102
3.4.8	Färbungen mit Antikörper Phospho-c-Jun (Ser73)	104
3.4.9	Negativkontrolle	106
4	Diskussion.....	107
4.1	Bedeutung von RelA bei der Entstehung von Hauttumoren	107
4.2	Einfluss von IKK α/β bei der Entstehung von Hauttumoren.....	118
4.3	Einfluss von c-Jun bei der Entstehung von Hauttumoren	120
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	121
6	Literaturverzeichnis	124
7	Veröffentlichungen aus der Arbeit	142
8	Abkürzungsverzeichnis	143
9	Abbildungsverzeichnis	145
10	Danksagung.....	150

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

1.1.1 Was versteht man unter dem NF- κ B Transkriptionsfaktor

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor und ein zentraler Regulator der Immunantwort (Pahl und Baeuerle, 1997). Zum ersten Mal konnte NF- κ B als Transkriptionsfaktor an einer bestimmten DNS-Region, dem Immunglobulin- κ -Ketten-Enhancer, in reifen B-Lymphozyten der Maus von Sen und Baltimore beschrieben werden (Sen und Baltimore, 1986). Später wurde NF- κ B in vielen anderen Zelltypen nachgewiesen. Beispielsweise in Zellen der Gefäßwand und in vielen immunologisch kompetenten Zellen. Er ist gewissermaßen in allen Körperzellen zu finden. Die Aktivierung von NF- κ B wird posttranskriptional reguliert. Darunter versteht man, dass sich NF- κ B bereits präformiert in der Zelle befindet und nicht mehr für eine Aktivierung synthetisiert werden muss. Man unterscheidet zwei Formen von NF- κ B. Eine inaktive Form, gebunden an I κ B-Proteine, welche im Zytoplasma lokalisiert ist (Baeuerle und Baltimore, 1988) und eine aktive Form, die im Zellkern nachweisbar ist. Sen und Baltimore fanden heraus, dass in Antikörper-produzierenden B-Zellen sowie aktivierten T-Zellen und Makrophagen NF- κ B konstitutiv aktiviert ist (Sen und Baltimore, 1986).

Zu den Stimuli, die NF- κ B aktivieren, gehören physikalischer Stress (ionisierende Strahlung, UV-Strahlung), Chemikalien (Phorbolester), zelluläre Botenstoffe, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren (TNF- α , IL-2, IL-8), oxidativer Stress in Form von H₂O₂ oder O₂- und infektiöse Agenzien (Lipopolysaccharide, Viren) (Grilli et al., 1993; Messer und Rupec, 2001).

Eine Vielzahl von Genen werden von NF- κ B reguliert, die z.B. Chemokine, Zytokine, Immunmodulatoren, Zelloberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle kodieren (Ghosh und Karin, 2002; Grilli et al., 1993; Pahl, 1999).

NF- κ B gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die man auf die Struktur bezogen in zwei Gruppen einteilen kann. Zur ersten Gruppe ordnet man p105 (NF- κ B 1) und p100 (NF- κ B 2) zu, die im Bereich der C-terminalen Domäne einen langen Ankyrinrest mit inhibitorischer Funktion aufweisen und somit auch zur Familie der I κ B-Proteine gehören. Die zweite Gruppe spiegelt mit RelA (p65) (Sizemore et al., 2002), p50, p52, RelB und c-Rel die aktive Klasse dieser Familie wider. Ihr

Erkennungsmerkmal ist eine kürzere DNS-Bindungsdomäne und eine c-terminale, die Transkription aktivierende, Domäne. p50 und p52 entstehen durch eine limitierte proteolytische Spaltung aus p105 bzw. p100 (die Ziffern geben das Molekulargewicht in kDa an). Die Mitglieder dieser NF- κ B-Familie besitzen eine gemeinsame, hochkonservierte Rel-Homologiedomäne (RHD, Rel-Homology-Domain) (Nolan und Baltimore, 1992), die aus ca. 300 Aminosäuren besteht und zwei immunoglobulinähnliche Domänen aufweist. Diese Domäne sorgt dafür, dass DNS-Interaktionen, Dimerisierungen, Transaktivierung und Interaktionen mit I κ B stattfinden (Karin und Ben-Neriah, 2000).

Des Weiteren liegen die Mitglieder der NF- κ B - Familie in den verschiedensten Zellen als Homo- oder Heterodimere vor. Am häufigsten ist das Heterodimer mit den Untereinheiten p50/RelA präsent (Siebenlist et al., 1997). Danach folgen die Homodimere p50/p50 und RelA/RelA. Das unterschiedliche, auf die Häufigkeit bezogene, Vorkommen dieser Dimere wird anhand ihrer untereinander abweichenden Primärstruktur begründet (Ganchi et al., 1993; Kunsch et al., 1992). Zudem zeichnen sich die einzelnen Dimere durch ihre Affinität zu unterschiedlichen κ B-Motiven aus. Man vermutet, dass dieser Mechanismus für die selektive Aktivierung von NF- κ B Zielgenen verantwortlich ist (Baeuerle und Henkel, 1994). Die DNS-Zielsequenz des NF- κ B-Transkriptionsfaktors stellt ein aus 10 Basen bestehendes Motiv dar (5`GGGRNNYYCC-3` oder 5`HGGARNYYCC-3`) daraus sind folgende Kombinationen ersichtlich: H=Adenin oder Cytosin oder Thymin; R= Adenin oder Guanin; Y=Cytosin oder Thymin, x steht für eine beliebige Aminosäure (Baldwin, Jr., 1996). Eine wichtige Funktion von NF- κ B ist die Aktivierung pro-inflammatorischer Zielgene, die eine schnelle Abwehrreaktion der Zelle und systematische Aktivierung des Immunsystems ermöglicht.

1.1.2 Die NF- κ B-Signaltransduktionskaskade

Die Aktivierung von NF- κ B kann durch eine Vielzahl von Stimuli erfolgen. Diese wiederum resultiert aus der Aktivierung des I-kappa-B-Kinase-Komplexes (Karin und Ben Neriah, 2000). Dies liegt daran, weil die inaktive Form von NF- κ B im Zytoplasma ruhender, nicht stimulierter Zellen an der inhibitorischen Untereinheit, I κ B, gebunden vorliegt. Zu ihrer Aufgabe gehört die Maskierung des Kernlokalisierungssignals (NLS)

in der RHD-Region von NF- κ B. Dadurch wird der NF- κ B - Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurückgehalten und es kann keine Translokation in den Zellkern erfolgen (Baldwin, 1996; Gosh et al., 1998). Man kennt mittlerweile sieben I κ B-Moleküle, I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl 3, p100 und p105 (Gosh et al., 1998). Alle diese I κ B-Moleküle besitzen eine sich wiederholende Region von 30-33 Aminosäuren, die Ankyrin-Repeats, die eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne darstellen und NF- κ B daran hindern, in den Zellkern zu translozieren. Die Mitglieder der I κ B-Familie besitzen unterschiedliche inhibitorische Spezifitäten, mit denen sie NF- κ B Dimere unterschiedlich hemmen können. I κ B α gehört zu den am besten analysierten I κ B-Molekülen. Es gliedert sich in drei strukturelle Domänen: eine 70-Aminosäuren lange N-terminale Region, eine 205-Aminosäuren lange zentrale Region, die aus Ankyrin-Repeats aufgebaut ist, sowie eine C-terminale 42 Aminosäuren umfassende Region, die die sogenannte PEST-Region enthält (Baldwin, 1996). Die Pest-Region/Sequenz besteht zu großen Anteilen aus Prolin, Glutamat, Serin und Threonin. Sie spielt eine essentielle Rolle bei der NF- κ B -Aktivierung durch die schnelle Degradation der I κ B-Moleküle (Naumann und Scheidereit, 1994).

Eine Ankyrin-Repeat-Domäne mit anschließender PEST-Sequenz befindet sich ebenfalls am carboxyterminalen Ende der Vorläuferproteine für p52 und p50 (p105 und p100). Die Vorläuferproteine p105 und p100 haben die Funktion als interne Inhibitoren durch Assoziation mit p65 oder c-Rel und sind Phosphorylierungsprozessen und proteolytischen Spaltungen nach Stimulierung, wie z.B. TNF α oder PMA, ausgesetzt. Die Phosphorylierung von I κ B α ist der erste Schritt der Degradierung des inhibierenden Moleküls. Diese wird vom IKK-Komplex ausgelöst, der einen 700-900 kDa großen Proteinkomplex (I κ B-Kinase-Komplex) (Zandi et al., 1997; DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997) darstellt und als Hauptregulator eine wichtige Funktion bei der NF- κ B Aktivierung einnimmt (Karin und Ben-Neriah, 2000; Israel 2000). Man vermutet, dass fast alle NF- κ B aktivierenden Signalkaskaden am IKK-Komplex zusammenlaufen. Der IKK-Komplex gehört zu den Proteinkinasen und besteht aus bisher drei bekannten Komponenten. Zum einen aus den Ser/Thr-Kinasen IKK α (I κ B Kinase α) und IKK β (I κ B Kinase β) als katalytische Komponenten und zum anderen IKK γ (I κ B Kinase γ) als regulatorische Untereinheit. Die zwei katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes, die I κ B-Kinasen IKK α (auch unter der Bezeichnung IKK1 oder CHUK bekannt) und IKK β (IKK2), haben 745

bzw. 756 Aminosäuren und weisen ein Molekulargewicht von ungefähr 85 bzw. 87 kDa auf. Strukturell sind sie bis zu 52% homolog. Sie enthalten neben der N-terminalen Kinasedomäne ein Leuzinzipper Motiv (proteininteragierende Leuzinreste), sowie ein Helix-Loop-Helix Motiv (Rothwarf und Karin, 1999). Man konnte nachweisen, dass beide I κ B an spezifischen Serinen phosphorylieren.

Zum einen konnte eine Phosphorylierung von I κ B β an den Serinen 19 und 23 durch IKK α beobachtet werden. Zum anderen wurde I κ B α an den Serinen 32 und 36 durch IKK β phosphoryliert, was sich aufgrund der höheren Affinität erklären lässt (Lee et al., 1998; Zandi et al., 1998). Vergleicht man die beiden abermals, so stellt IKK α für die Aktivierung des I κ B Kinasekomplexes durch pro-inflammatorische Stimuli keine Notwendigkeit dar, sondern besitzt eine entscheidende Funktion bei der Proliferation und Differenzierung epidermaler Keratinozyten (Hu et al., 2001; Hu et al., 1999; Takeda et al., 1999). Dagegen kann man IKK β als die katalytische Untereinheit einordnen, die für die NF- κ B Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist (Li et al., 1999; Tanaka et al., 1999).

Die dritte regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes mit einem Molekulargewicht von 48 kDa ist das Protein IKK γ (Rothwarf et al., 1999). Da dieses Protein von mehreren Arbeitsgruppen entdeckt wurde, findet man es in der Literatur unter verschiedenen Bezeichnungen. Folgende Varianten der Bezeichnung sind gängig, NF- κ B essential modulator (NEMO) (Yamaoka et al., 1998), IKK-associated protein 1 (IKKAP1) (Mercurio et al., 1999) und Interacting protein (FIP-3) (Li et al., 1999). IKK γ hat eine regulatorische Funktion für die NF- κ B-Aktivierung, aber keine Kinaseaktivität (Mercurio et al., 1997; Rothwarf et al., 1998; Rothwarf und Karin, 1999; Zandi et al., 1997). Eine Vielzahl extrazellulärer Reize lösen eine Phosphorylierungskaskade aus. Es gibt zwei Zytokine, die zu Beginn von Entzündungsantworten eine entscheidende Rolle spielen, Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1). Die Makrophagen, welche zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören, produzieren diese beiden Zytokine als Antwort auf Infektionen oder Gewebsverletzungen. Am Anfang des Signalweges kommt es zur Bindung des Zytokins, z.B. TNF α , an die für das Zytokin passenden Zelloberflächen-Rezeptoren, in diesem Fall TNF α -Rezeptoren. Es folgt eine Umlagerung der in einem Cluster zusammenstehenden intrazellulären Anteile. Daran können sich jetzt intrazelluläre Signalproteine, wie die Receptor Interacting

Proteinkinase (RIP) und zwei Adapterproteine, das TNF-Associated-Death-Domain-Protein (TRADD) und TNF-Receptor-Associated-Factor 2 (TRAF2), anlagern. Diese haben die Aufgabe, die I κ B Kinase Kinase Kinase (IKKK) zu aktivieren, die wiederum die I κ B Kinase Kinase (IKK) phosphoryliert und aktiviert. IKK sorgt nachfolgend, dass die I κ B-Proteine an spezifischen Serinresten phosphoryliert werden. Nun wird eine Polyubiquitinierung durch die spezifische Ubiquitinligase der SCF (Skp-1/Cul/Fbox) Familie eingeleitet (Yaron et al., 1998), der sich eine Degradierung von I κ B an 26S Proteosomen anschließt (Ben Neria, 2002; Tan et al., 1999). NF- κ B wird jetzt freigesetzt und das nukleäre Lokalisationssignal am aktivierten NF- κ B transloziert dieses Protein in den Zellkern. Dort wird durch die Bindung an κ B-Motive in Promoter- und Enhancersequenzen die Transkription der Zielgene induziert (Baeuerle und Henkel, 1994; Collins et al., 1995; Siebenlist et al., 1994; Verma et al., 1995). Zu den von NF- κ B induzierten Zielgenen gehören unter anderem Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), Adhäsionsmoleküle (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1) (Vandermeeren et al., 1997), Akute-Phase-Proteine (Angiotensinogen, Komplementfaktoren, Inducible Effector Enzymes (iNOS, COX-2), Immunrezeptoren, wie MHC-Proteine (Ghosh et al., 1998; Hatano et al., 2001; Kopp und Medzhitov, 1999; Zhang und Ghosh, 2001), anti-Apoptose Proteine (IAPs, TRAFs), Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF) und Transkriptionsfaktoren mit ihren Inhibitoren (c-Rel, p105, I κ B α). Aufgrund der Induktion von auch potentiell toxischen Mediatoren durch NF- κ B wird konstitutiv aktiviertes NF- κ B für die Zelle schädlich. Demzufolge sind die prägenden Eigenschaften von NF- κ B, die schnelle Induzierbarkeit, sowie das schnelle Abklingen seiner Aktivierung. Es existiert eine negative Feedback-Regulation, bei der I κ B eine wichtige Rolle spielt. Aktiviertes NF- κ B besitzt die Fähigkeit, zeitlich verzögert die Expression des Gens für I κ B α zu induzieren (Sun et al., 1993). Anschließend erfolgt die Wanderung der neu synthetisierten I κ B α Moleküle in den Zellkern und die Bindung an NF- κ B.

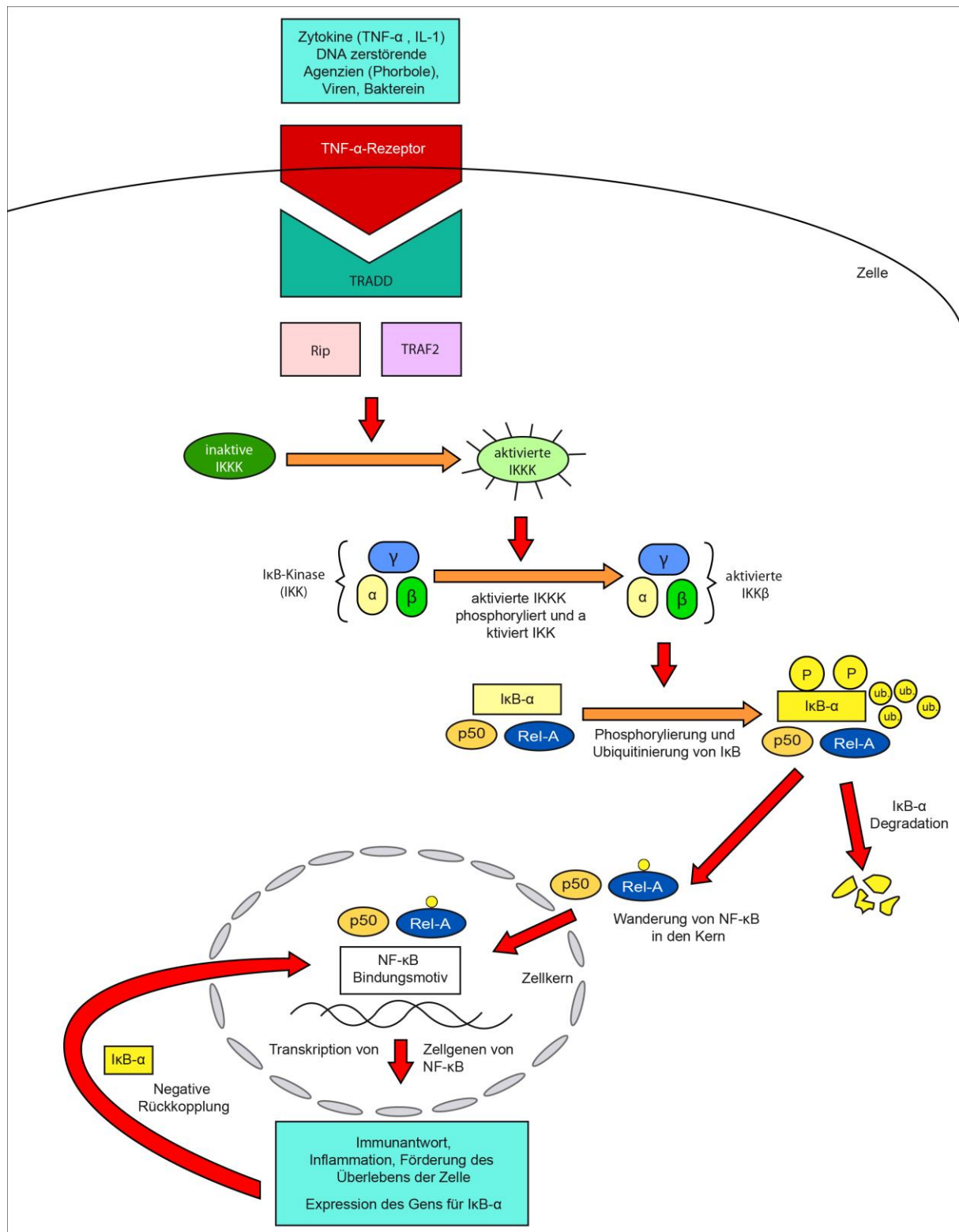


Abbildung 1.1 Darstellung des klassischen NF-κB – Signaltransduktionsweges

Dies führt wiederum zur Dissoziation des Dimers von der DNS infolge einer höheren Affinität zu seinem Inhibitor (Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Brown et al., 1993; Chiao et al., 1994; Ganchi et al., 1993). Anschließend wandert der Komplex mit Hilfe der Exportsequenz NES (Nuclear Export Sequence) von IκBα in das Zytoplasma der

Zelle zurück. Das ist mit für das schnelle Abklingen der NF- κ B Aktivität verantwortlich (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Rodriguez et al., 1999).

1.1.3 Aufbau der Haut und welche Rolle spielt NF- κ B, sowohl physiologisch, als auch pathophysiologisch

Die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers weist eine Gesamtfläche von 1,5 - 2 m² auf. Man unterteilt die Haut in drei Schichten, in die Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Fettgewebe). Von großer Bedeutung ist ihre chemische, mechanische und immunologische Barrierefunktion.

Betrachtet man den Aufbau der Epidermis genauer, so werden fünf verschiedene Zellschichten unterschieden. 90% der epidermalen Zellen sind Keratinozyten, die während ihres fünf- bis siebenwöchigen Entwicklungsprozesses von basal nach apikal wandern. Je nachdem in welcher Schicht sich gerade die Keratinozyten während ihres Entwicklungszykluses befinden, werden diese unterschiedlich bezeichnet. Man spricht von Basalzellen, wenn sie sich im Stratum basale befinden. Diese Schicht setzt sich aus kubischen bis hochprismatischen, säulenartig angeordneten Epithelzellen zusammen. Zu den Funktionen des Stratum basale gehört die Regeneration des Epithels. Eine Vielzahl von adulten Stammzellen weisen eine hohe Mitoserate auf. Sie sind die Basis für die Entwicklung der reifen Keratinozyten und durchlaufen Differenzierungsprozesse über das Stratum spinosum, Stratum granulosum bis zum Stratum corneum (Hornschicht). Hier bezeichnet man die kernlosen Zellen als Korneozyten oder Hornzellen, die plättchenartig verzahnt sind und an der Oberfläche angekommen, als Hornschuppe abgeschilfert werden. Charakteristisch für das Zellinnere der Korneozyten sind die Keratinfilamente in einer amorphen Proteinmatrix.

Aufgrund der ubiquitären Präsenz des Transkriptionsfaktors NF- κ B spielt dieser auch in der Haut eine entscheidende Rolle, insbesondere bei der Proliferation und Apoptose. NF- κ B kann zelltyp- und situationsabhängig sowohl als Tumorpromotor oder als Tumorsuppressor wirken (Perkins, 2004).

In den Basalzellen liegen die NF- κ B-Proteine im Zytoplasma vor. Dagegen sind sie in differenzierten suprabasalen Zellen zusätzlich im Zellkern nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass die Aktivierung von NF- κ B auch mit Wachstumsstillstand in direkten Zusammenhang steht (Seitz et al., 1998 und 2000).

Wie NF- κ B nun genau wirkt, welche Funktionen er hat, hängt davon ab, in welchem Zelltyp sich der Transkriptionsfaktor befindet. Es hat sich gezeigt, dass das Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen von entscheidender Bedeutung ist. Ein Ausbruch der Hautkrankheit Psoriasis erfolgte beispielsweise unter anderem erst dann, wenn eine Störung in der Signalwirkung (verstärkte Aktivierung von NF- κ B durch ubiquitäre Deletion von I κ B α) sowohl bei den Keratinozyten, als auch bei den Immunzellen vorlag. Fand eine Fehlsteuerung des Signaltransduktionsweges in nur einem der Kompartimente statt, beobachtete man einen anderen Phänotyp (Rebholz et al., 2007).

1.1.4 Aufbau des Dickdarms und welche Rolle spielt NF- κ B, sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch

Der Dickdarm kann als Vergleich zu der Haut herangezogen werden, weil anhand dieses Organs gezeigt werden konnte, welche Rolle NF- κ B im Rahmen von entzündlichen Prozessen bei der Onkogenese hat.

Mit einer Länge von 1,5 m ist der Dickdarm der letzte Teil des Verdauungstraktes und beginnt an der Einmündung des Dünndarms in den Blinddarm. Er wird in mehrere Abschnitte unterteilt, in den Blinddarm (Caecum), den Grimmdarm (Colon), der sich wiederum in den aufsteigenden Teil (Colon ascendens), den absteigenden Teil (Colon descendens) und S-förmig gekrümmten Teil (Colon sigmoidum) untergliedert, und den Mastdarm (Rektum).

Unzählige Funktionen werden dem Dickdarm zugeschrieben. Hier soll eine der wichtigsten Funktionen des Dickdarms (speziell des Colons), die Barriere- und Abwehrfunktion im Vordergrund stehen.

Diese Funktion des Darms zeigt Parallelen zur Haut und gibt Anlass zur Diskussion über die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Krebsentstehung in diesen Organen.

Die Darmflora enthält ein Gemisch apathogener und pathogener Keime. Nur solange diese im Gleichgewicht stehen und das Eindringen von Fremdstoffen in die Darmwand verhindern, ist der Darm in einem gesunden Zustand.

Ein Ungleichgewicht zwischen mikrobiellen und wirtseigenen Signalen ist sowohl für die Entstehung chronischer entzündlicher Darmerkrankungen bis hin zu Krebserkrankungen entscheidend.

Bezogen sowohl auf die Funktion als auch auf den Aufbau der Dickdarmwand lassen sich Parallelen zu der Epidermis der Haut ziehen. Beide weisen ein Epithel vor, dessen Aufgabe es ist, den Transport in resorptiver oder sekretorischer Richtung zu regeln und eine Barriere zwischen innerem und äußerem Kompartiment zu bilden. Bei der Haut spricht man von einem mehrschichtigen Epithel. Der Darm hingegen besitzt ein einschichtiges hochprismatisches Epithel, welches die gesamte Oberfläche der Darmschleimhaut überzieht. Bei diesem Epithel spricht man nicht mehr nur von einer "inerten und mechanischen" Barriere zwischen Darmbakterien und Körperinneren, sondern es stellt vielmehr einen integralen Bestandteil der Immunantwort im Darm dar. Die Dickdarmwand wird von Schleimhaut, der Tunica mucosa ausgekleidet. Diese unterteilt man in drei Unterschichten. Eine Art Deckgewebe ist die oberste Schicht (Lamina epithelialis mucosae, einschichtiges Epithel). Hier sind besonders viele schleimbildende Becherzellen eingelagert. In diesem Bereich der Schleimhaut befinden sich zahlreiche tiefe Einstülpungen, sogenannte Lieberkühn-Krypten. Diese Darmkrypten vergrößern die Epitheloberfläche und in ihrer Tiefe findet man neben den Enterozyten auch Stammzellen. Es schließt sich dann die nächste Unterschicht an, die Lamina propria mucosa. Sie enthält viele Lymphozyten und Lymphfollikel und hat somit einen entscheidenden Part bei der Abwehrfunktion des Darmes inne. Ihr folgt die Lamina muscularis. Weitere aufeinanderfolgende Schichten sind die Tunica submucosa, Tunica muscularis und die Tunica serosa. Die Epithelschicht wird wie die Epidermis kontinuierlich erneuert. Von entscheidender Bedeutung ist die Gewährleistung eines Gleichgewichtes zwischen Zellverlust und Zellerneuerung. Im unteren Drittel der Krypten befinden sich die Kolonstammzellen, von denen die Zellreplikation ausgeht. Ihre Teilung bringt wieder eine Stammzelle und eine Tochterzelle hervor. Mehrfach teilt sich die Tochterzelle auf ihren Weg von der Kryptentiefe zum Darmlumen und vollendet ihre Differenzierung (Potten und Loeffler, 1990). An der Oberfläche angelangt kommt es bei der Epithelzelle wie bei den Keratinozyten zur Abschilferung. Wird die Homöostase der Stammzellen gestört, kann dies zur Krebsentstehung führen (Schwitalla et al., 2013). Die Barrierfunktion gewinnt ebenso pathophysiologisch an Bedeutung durch ihre Veränderungen bei Magen-Darm-Erkrankungen. Unter Veränderungen versteht man, dass die epitheliale Barrierfunktion beeinträchtigt ist und für Antigene durchlässiger wird. Hierbei stellt NF- κ B eine Art Überlebenssignal für die Darmzellen dar. NF- κ B wird in den

Epithelzellen und Lamina propia-Makrophagen aktiviert. Er spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von pro-inflammatorischen Zytokinen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Fehlt der Transkriptionsfaktor sterben die Darmzellen leichter ab. Dies führt zur Entstehung mehrerer Lücken in der Epithelschicht, durch die pathogene Keime eindringen können. Es werden eine starke Abwehrreaktion und Entzündungsprozesse ausgelöst. Diese wiederum sind für das Absterben der Epithelzellen verantwortlich und der Weg für die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist geschaffen.

1.2 Die Relevanz des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Karzinogenese

AP-1 (Aktivatorprotein-1) ist eine Sammlung von dimerischen Transkriptionsfaktoren. Die Dimere stellen verschiedene homo- und heterodimere Proteinkomplexe dar, deren Untereinheiten sich aus den Mitgliedern der Jun, Fos und AFT (activating transcription factor) Proteinfamilien zusammensetzen.

Zur Familie der Jun-Proteine werden c-Jun, JunB und JunD zugeordnet. Jun-Proteine, speziell c-Jun als wichtigster Vertreter der Jun-Proteine, besitzen die Eigenschaft, sehr stabile Heterodimere mit den Proteinen aus der Fos- und ATF-Familie auszubilden. Man konnte auch die Bildung von Jun-Jun Homodimeren beobachten, diese weisen aber nur eine schwache Transaktivierungspotenz auf. Ebenso von geringer Bedeutung für die Karzinogenese sind JunB und JunD, die ein schwächeres Potential zur Zelltransformation zeigen.

Zu den Mitgliedern der fos-Familie gehören c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2. Man kann diese noch in transformierende (c-Fos, Fos-B) und nicht-transformierende (Fra-1 und Fra-2) Fos-Proteine unterteilen. c-Fos und Fos-B spielen eine wichtige Rolle bei der Transformation von Zellen, da man bei diesen Fos-Proteinen transaktivierende Domänen in ihren N- und C-terminalen Bereichen entdeckt hat. Den nicht-transformierenden Fos-Proteinen fehlt diese Eigenschaft.

Im Vergleich zu Jun-Proteinen bilden Fos-Proteine nur Heterodimere aus. Die Dimerisierung kann mit jedem beliebigen Jun-Protein erfolgen. Sowohl die Jun als auch die Fos und AFT Untereinheiten gehören der bZIP (basic region leucin zipper) Familie von DNS-bindenden Proteinen an (Angel und Karin, 1991; Karin 1995; Karin et al., 1997). Sie kennzeichnet eine sogenannte Leuzin-Zipper Domäne (Kouzarides und Ziff, 1988), die aus einer α -Helix besteht und deren jede siebte Aminosäure

(meistens die AS: Leuzin) hydrophobe Eigenschaften und eine bei allen Jun- und Fos-Proteinen nachgewiesene „basische Region“ aufweist, die entscheidend für die Bindung an die AP-1-BS ist (Vogt und Bos, 1990). Sobald es zum Kontakt zweier dieser Domänen aus zwei Proteinen kommt, entstehen sowohl Homo-(z.B. Jun-Jun) als auch Hetero-Dimere (z.B. Jun-Fos). Diese AP-1 Dimere binden an spezifische DNS-Sequenzen, die cis-Elemente. Von Jun-Jun und Jun-Fos-Dimeren werden für die Bindung besonders TRE (TPA response elements)-Abschnitte (TRE; 5`-TGA G/C TCA-3`) (Angel et al., 1987) der DNS bevorzugt. Diese spezifische DNS-Sequenz hat ihren Namen durch das Phorbol-ester TPA erhalten, weil TPA als klassischer Aktivator der AP-1-Transkriptionsfaktoren bekannt ist (Gubermann et al., 2005) und bevorzugt die extrazellulär regulierten Kinasen der MAPK-Familie aktiviert, die die Jun/Fos Aktivität im hohen Maße stimuliert. Es wird aber auch in der Literatur anstelle von TRE die Bezeichnung AP-1 Bindungsstelle (AP-1-BS) verwendet. Entscheidend für das Binden an die AP-1-BS und die Aktivierung von Genen ist die Dimerbildung von AP-1. Die AP-1 Aktivität kann auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei verschiedene Stimuli. Zu erwähnen sind da Tumorpromotoren (TPA-führt zur Transformation epidermaler Zellen), Karzinogene, Wachstumsfaktoren und Zytokine (TNF- α , IL-1), die den Prozess veränderter Genexpression herbeiführen (Kustikova et al., 1998; Angel und Karin, 1991). Über einen Rezeptor werden Signalkaskaden gestartet (z.B. die MAP (mitogen activated protein)-Kinase-Kaskade. Bei diesen Signaltransduktionswegen kommt es zur Translokation der aktivierten Kinase in den Zellkern. Diese bewirkt die Phosphorylierung der AP-1 Proteine mit nachfolgender Verstärkung der AP-1 Aktivität. Somit kann die AP-1 Aktivität sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell reguliert werden. Die Jun N-Terminal Kinase phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Jun N-terminal an den Seitenketten Ser63 und Ser73 und erhöht damit seine transkriptionelle Aktivität (Hibi et al., 1993). AP-1 Untereinheiten wirken entscheidend bei der Regulation komplexer biologischer Prozesse, wie Zellproliferation, Transformation, Zelldifferenzierung (Karin, 1995), Embryonalentwicklung, Angiogenese, Regeneration der Haut, Immunantwort, Entzündungsprozessen, Apoptose und Schutzwirkungen gegenüber DNS-schädigenden Substanzen, mit.

Die Verwendung des Tumorpromotors TPA in unseren Experimenten als Aktivator des PKC/MAPK/AP-1 Signaltransduktionsweges (Blumberg, 1991; Huang et al., 1997) hat gezeigt, dass AP-1 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielt.

1.3 Tumorentstehung

1.3.1 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese

Zu Beginn stellt sich zunächst die Frage, was ist eigentlich Krebs? Krebserkrankungen stellen in den westlichen Industrieländern nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweitgrößte Todesursache dar. Die Tendenz der Tumorerkrankungen ist in einer industriellen und modernen Welt steigend, in der unzählige äußere Faktoren auf den menschlichen Körper einwirken.

Geht man weit in die Geschichte zurück, so wurde der Begriff Krebs von Hippokrates erstmalig verwendet. Er war der Ansicht, dass ein Brustgeschwür Ähnlichkeiten mit den Beinen eines Krustentieres hatte. Auch Galenus stellte einen optischen Vergleich zwischen den geschwollenen Venen eines äußeren Tumors mit Krebsbeinen dar. Weit fortschrittlicher in seiner Begriffsverwendung war Aristoteles, der Krebs für ein oberflächlich feststellbares, in benachbarte Organe infiltrierendes und eingewachsenes Geschwulst hielt. Die Krankheit Krebs kann man auf verschiedene Weise definieren. Prinzipiell ist Krebs ein Sammelbegriff von mehr als 100 Krankheitsbildern. Das Wesen dieser Krankheit ist ein unkontrolliertes Wachstum von Körperzellen, die sich teilen und gesundes Gewebe schädigen. Anders ausgedrückt, ist Krebs eine Krankheit, bei der sich individuelle mutante Klone auf Kosten der benachbarten Zellen ausbreiten und gesundes Gewebe zerstören. Die zuletzt formulierte Definition deutet auf die Entstehung von Krebs hin. Krebszellen zeichnen sich durch Veränderungen ihres genetischen Materials aus. Zu einem großen Teil treten chromosomale Abweichungen und Umlagerungen auf, sogenannte somatische Mutationen. Aufgrund einer Vielzahl von Veränderungen im genetischen Material kommt es zum unkontrollierten Wachstum der Zellen, die sich ununterbrochen unter Weitergabe des veränderten genetischen Materials teilen und demzufolge umliegendes Gewebe morphologisch verändern. Zur Beschreibung der Tumorentstehung verwendet man das Mehrstufenmodell der Karzinogenese.

Das klassische und schon etwas ältere Dreistufenmodell gliedert sich in die drei Phasen: Initiation, Promotion und Progression (Beerenblum, 1941), wie bezogen auf

die Maus in Abbildung 1.2 dargestellt. In dem neueren Modell (Abbildung 1.3) wird noch die Konversion hinzugenommen, die sich zwischen Promotion und Progression eingliedert (Beerenblum, 1941; Califano et al. 1996; Bedi et al., 2000; Hofmann 2000; Das und Nagpal, Ha und Califano, 2003; Peres et al., 2005).

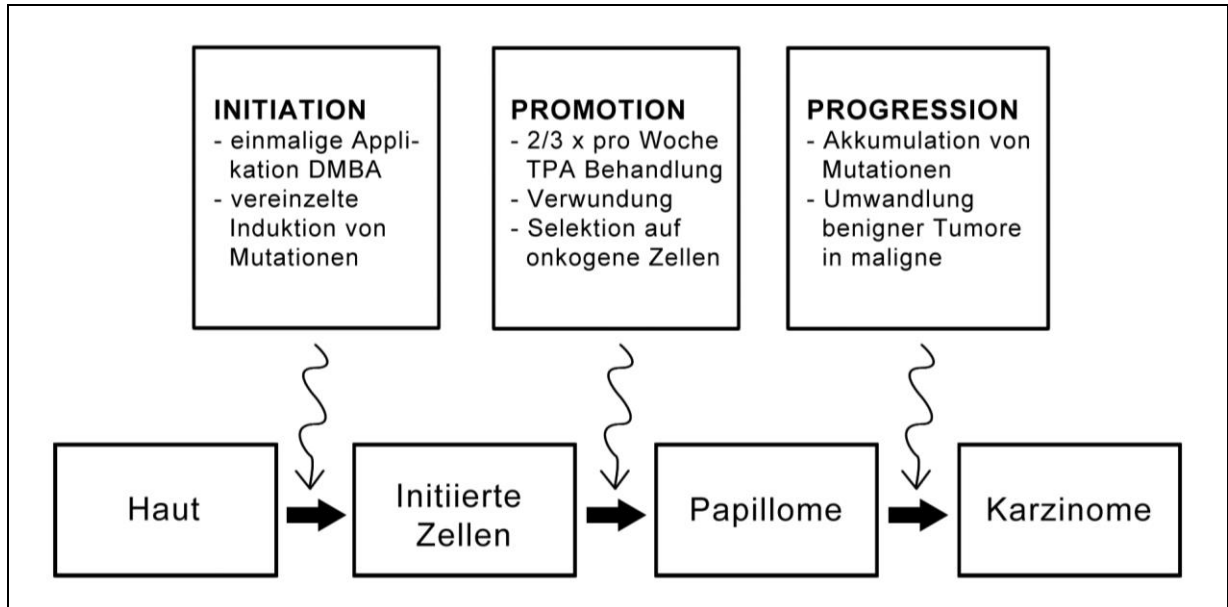


Abbildung 1.2: Das Maushautmodell der Mehrstufenkarzinogenese (nach Beerenblum 1941, verändert)

Unter Initiation versteht man die Induktion genetischer Veränderungen in einzelnen Zellen. Für die Initiation ist eine einzelne Mutation ausreichend. Jedoch reicht die Initiation nicht für eine Tumorentstehung aus.

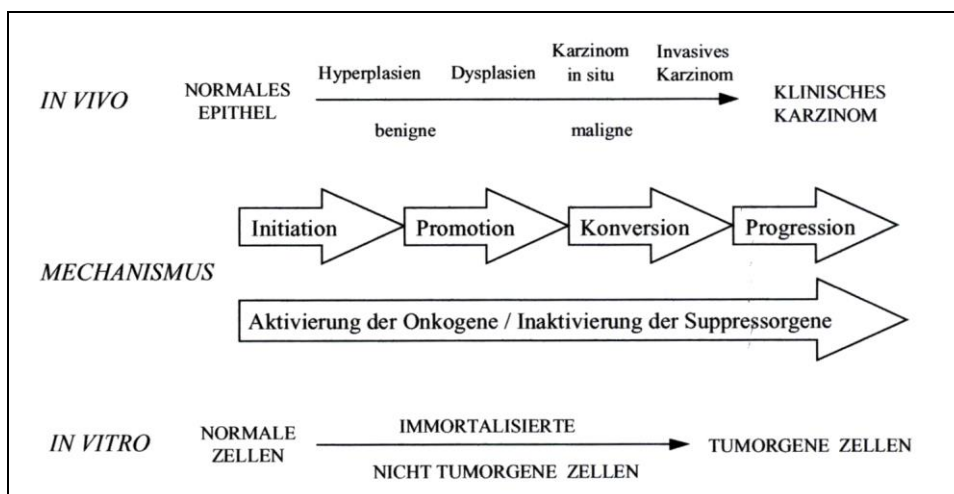


Abbildung 1.3: Mehrstufiger Karzinogeneseprozess in menschlichen epithelialen Gewebe (nach Grafström)

Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Beide Prozesse sind irreversibel und es entstehen

potenzielle Tumorzellen, die sich phänotypisch nicht von den umliegenden normalen Zellen unterscheiden. In unseren Versuchen wird die Initiation durch DMBA, 7,12-Dimethylbenz[a]-anthrazen, ausgelöst.

Im nächsten Schritt, der Promotion, werden die initiierten Zellen in morphologisch erkennbare, präneoplastische Zellen überführt. Ein weiteres Merkmal der Zellen ist der Verlust der Apoptosefähigkeit. Des Weiteren wird das Zellwachstum bei der Promotion stimuliert, was unter anderem durch Eingriffe in Signalketten erfolgt. Der Promotor, der für die Stimulation verantwortlich ist, wird über einen längeren Zeitpunkt und mit einer definierten Menge auf das Gewebe aufgetragen. Erst dann können sich Papillome, benigne Tumore mit plattenepithelialer Differenzierung, bilden. Dies zeigt, dass zur Promotion meist ein längerer Zeitraum erforderlich ist. Im Vergleich zu allen anderen Phasen, ist der Prozess der Promotion reversibel.

Durch Initiation und Promotion entstehen zunächst benigne Tumore. Wandeln sich diese in maligne Tumore um, spricht man von Progression. In dieser Phase beobachtet man eine zunehmende genetische Instabilität der Zellen, die die Fähigkeit erlangen in umliegende gesunde Gewebe einzudringen bis hin zur Absiedlung über Blut und Lymphgefäße in andere Organe. Im klassischen Mehrstufenmodell schließt die Progression sich lückenlos an die Promotion an, während im neuartigen Modell der Progression eine Vorstufe, die Konversion, zugeordnet wird. Diese ist durch Akkumulation von Mutationen, Angiogenese und exzessive Proliferation gekennzeichnet. Im normalen Zellzyklus herrscht ein Gleichgewicht zwischen Schädigung und Reparatur von genetischem Material. Dieses Gleichgewicht kann gestört werden, wenn endogene und exogene Noxen mit unterschiedlicher Weise auf dieses Gleichgewicht einwirken. Ob am Ende die DNS geschädigt wird und dieser Schaden zur Entwicklung eines malignen Tumors führt, hängt maßgeblich von den zahlreichen Abwehr- und Reparaturmechanismen des Organismus ab. Eine hohe Anfälligkeit zeigen Zellen, die sich gerade in der Zellteilung befinden, weil es den endogenen und exogenen Noxen in diesem Zustand einfacher gemacht wird, auf das instabile Riesenmolekül DNS einzuwirken. Der Organismus ist in der Lage die spontanen und induzierten Mutationen vollständig zu reparieren, wenn die verschiedenen einwirkenden Faktoren im Niedrigdosis-Bereich auftreten. Kommt es aber zu dessen Konzentrationsanstieg und/oder wirken diese über einen längeren Zeitpunkt auf den Organismus ein, dann ist es nicht mehr möglich, entstandene Schäden zu beheben. Der Grundstein für die Entwicklung von

malignen Tumoren ist damit gelegt. Die Auslöser für die Kanzerogenese kann man vereinfacht in endogene und exogene Faktoren einteilen. Zu den endogenen Faktoren gehört zum Beispiel das spontane Auftreten von DNS-Schäden, die durch hochreaktive Sauerstoffradikale entstehen, ohne die Einwirkungen äußerer Faktoren. Für diese Arbeit sind die exogenen Faktoren von Bedeutung. Allgemein zählt man dazu physikalische und chemische Noxen, ionisierte Strahlung, wie Röntgen- oder Gammastrahlung und UV-Licht, mutagene Chemikalien, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (DMBA), Onkoviren und verschiedenen RNS-Viren. Alle diese Faktoren gehören der Gruppe der Kanzerogene an. Diese kann man wiederum in genotoxische Kanzerogene bzw. Initiatoren und nicht-genotoxische Kanzerogene bzw. Promotoren unterteilen. Beide spielen beim Durchführen von unseren Versuchen eine wichtige Rolle. Genotoxische Kanzerogene haben die Eigenschaft mit Bestandteilen der Zelle zu reagieren, hauptsächlich mit der DNS und sind somit mutagen. Man unterscheidet direkte und indirekte Kanzerogene. Direkte Kanzerogene sind chemisch reaktive Substanzen, die keiner Metabolisierung bedürfen, um kanzerogen zu wirken. Für unsere Versuche verwendeten wir das indirekte Kanzerogen DMBA. Diese Substanz muss erst metabolisch aktiviert werden, um eine kanzerogene Wirksamkeit aufweisen zu können. Unter nicht-genotoxischen Kanzerogenen versteht man Substanzen, z.B. der für unser Experiment verwendeter Tumorpromotor TPA, die keine Reaktion mit der DNS eingehen und somit nicht-mutagen sind. Ohne metabolisch aktiviert zu werden und in Abhängigkeit von einer Schwellendosis (Abbildung 1.4), zeigen sie biologische Wirkungen, die die Voraussetzung für die Entstehung maligner Tumore sind. Zusammengefasst kann man Krebs als eine Erkrankung verstehen (Boveri, 1914 und Bauer, 1928), die durch Veränderung des genetischen Materials verursacht wird.

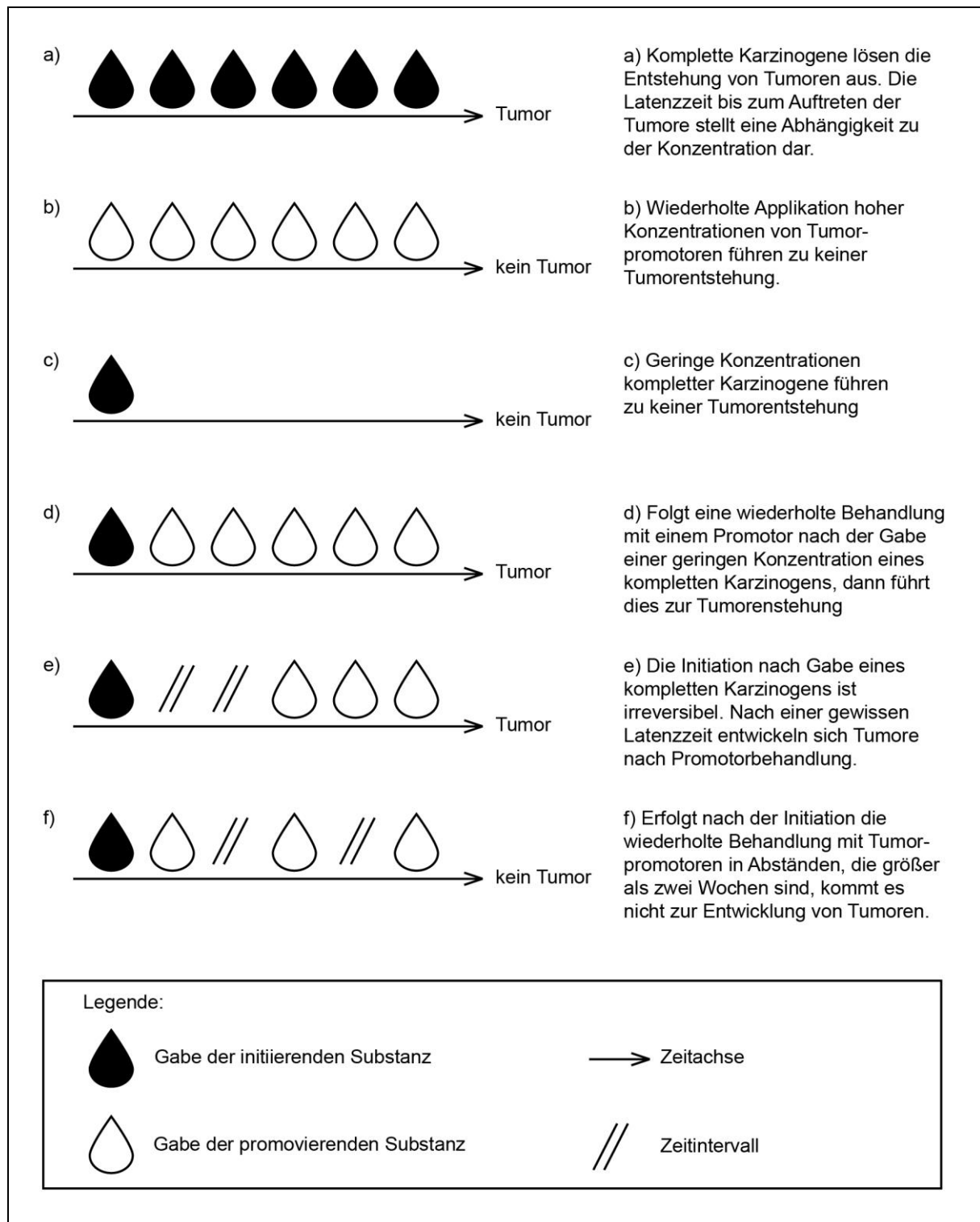


Abbildung 1.4: Charakterisierung von Initiation und Tumorpromotion (nach Boutwell 1964, verändert)

1.3.2 Welche Funktionen haben DMBA und TPA/PMA bei der Einwirkung auf die Haut der Maus?

1.3.2.1 DMBA - ein Tumorinitiator

DMBA steht für 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen (Abbildung 1.5) und wird in die Gruppe der Tumorinitiatoren eingeordnet.

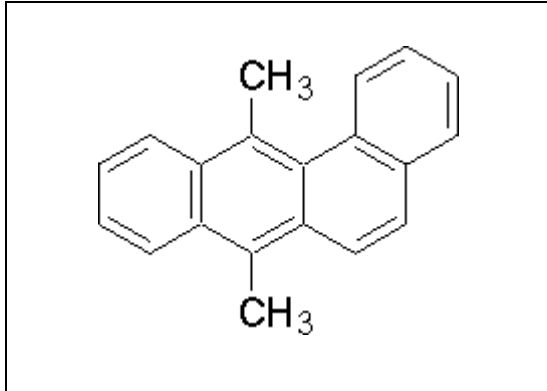


Abbildung 1.5 : 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen

Trägt man solch ein mutagenes, chemisches Karzinogen mehrmals auf die Haut auf, dann führt das zur Entstehung eines spinözellären Karzinoms. Bei einmaliger und alleiniger Applikation von DMBA kommt es im Normalfall noch nicht zur Ausbildung von Tumoren oder anderen sichtbaren Anomalien, aber es löst die Bildung von Mutationen aus.

Diese genetischen Schäden sind oft irreversibel. Man bezeichnet eine chemische Substanz, die solche Auswirkungen auf einem Organismus hat, als Tumorinitiator. Auch der Begriff „inkomplettes Kanzerogen“ wird verwendet. Er beschreibt eine Substanz, die nur eine initiiierende und keine promovierende Wirksamkeit aufweist. Diese initiiierende Wirkung des Benz[a]anthrazens DMBA, welches zur Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) gehört, lässt sich folgendermaßen erklären. Es wird zunächst im Organismus mit Hilfe eines komplexen Enzymsystems (Cytochrom-P450-Enzymen) zu reaktiven Stoffwechselprodukten metabolisiert. Genauer betrachtet stellt das Benz[a]anthrazen selber nicht das Kanzerogen dar, sondern sein Stoffwechselprodukt, ein sogenanntes Dihydrodiolepid, welches mit der DNS Addukte bildet (RamaKrishna et al., 1992). Die Entstehung von DNS-Addukten erfolgt durch die kovalente Bindung von elektrophilen Molekülen mit den freien Elektronenpaaren der in der DNS vorhandenen Basen (Lewis-Komplex). Diese Addukte sind für die strukturellen Veränderungen der DNS und somit für die Störung von normalen zellulären

Funktionen, wie DNS-Reparatur, Transkription und Replikation verantwortlich (Friedberg et al., 1995). Dies wird als genotoxische Wirkung bezeichnet, was letztendlich zu Mutationen führt.

1.3.2.2 TPA/PMA - ein Tumorpromotor und seine Auswirkungen

TPA/PMA steht für Tetradecanoyl-12,13-phorbolazetat/Phorbol-12-myristat-13-azetat (Abbildung 1.6) und gehört zur Gruppe der Tumorpromotoren. Diese Art chemischer Substanzen zeigt im Gegensatz zu Tumorinitiatoren allein keine mutagene Wirkung. Nur wenn auf die Haut mehrmals und in bestimmten Abständen ein Tumorpromotor aufgetragen wurde und die Haut zuvor einmaligen Kontakt mit einem Tumorinitiator hatte, kommt es in der Regel zur Entstehung von Tumoren.

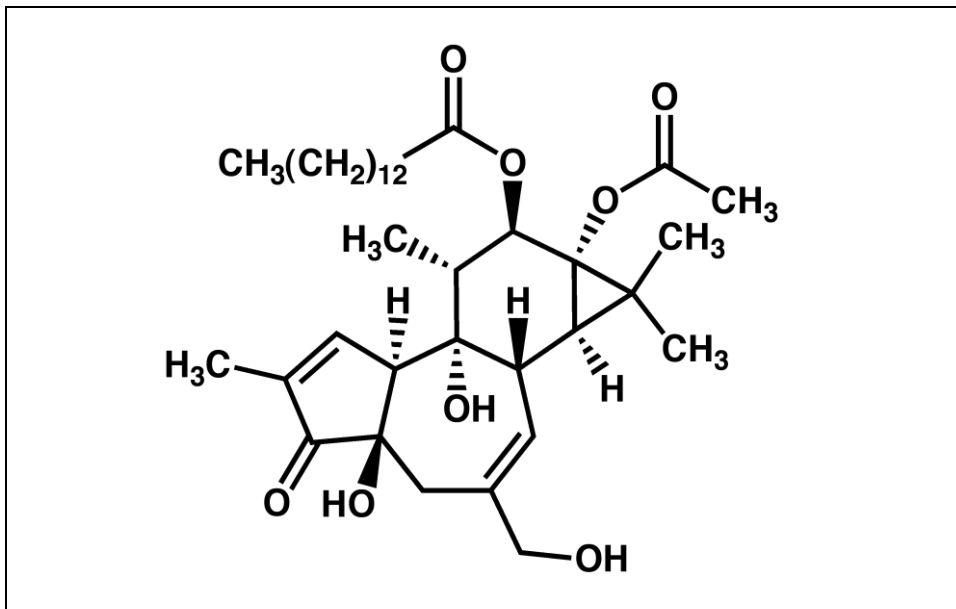


Abbildung 1.6 : Tetradecanoyl-12,13-phorbolazetat/Phorbol-12-myristat-13-azetat

Chemisch betrachtet, gehört TPA zur Klasse der Phorbolster. Phorbolster sind wiederum Fettsäureester des Diterpenalkohols Phorbol. Sie sind im Milchsaft zahlreicher Wolfsmilchgewächse enthalten und weisen eine hohe Giftigkeit auf (Hecker und Schmidt, 1974; van Duuren et al., 1968). Man kennt heute ca. 2000 Arten der Gattung der Wolfsmilchgewächse, Euphorbiaceae. Einst wurde der Milchsaft von Wolfsmilcharten zur Verfälschung von Drogen benutzt und pharmazeutisch als Abführ- und Brechmittel eingesetzt. Tetradecanoyl-12,13-phorbolazetat (TPA) selbst ist ein wirksamer Bestandteil des Crotonöls. Dieses Öl gewinnt man aus den Samen des Wolfsmilchgewächses *Croton tiglium*. Da die

Anwendung des Öls zu einer hämorrhagischen Enteritis führt, ist der Einsatz als Abführmittel obsolet. Aufgrund seiner Wirkung als Tumorpromotor wird heute TPA verstärkt zur Erforschung der Tumorentstehung in Zellkultursystemen und in der Mäusehaut eingesetzt. Es nimmt einen wichtigen Platz als klassische tumorpromovierende Substanz im experimentellen Modell der Mehrstufen-Karzinogenese ein (Boutwell, 1985; Hecker 1984; Marks und Gschwendt, 1995). Wie bereits oben erwähnt, weisen Tumorpromotoren selbst bei mehrmaliger Applikation keine karzinogene Wirkung auf. Nur wenn man vorher mit einem Karzinogen initiiert, wächst die Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung stark an. Man weiß heute, dass die Latenzzeit, der Zeitraum nach Initiation und Promotion, sich über mehrere Jahre hinziehen kann. Damit es überhaupt zum Tumorwachstum kommt, muss bei einem Promotor ein Schwellenwert der Konzentration überschritten werden. Nach dem Modell der Tumorinitiation und -promotion führt das Auftragen einer einmaligen hochkonzentrierten Menge von z.B. TPA zu keiner Tumorentstehung, dagegen eine wiederholte niedrigkonzentrierte Menge schon.

Über die Wirkungsweise von TPA existieren viele Theorien. Phorbolster stimulieren zum einen die Proteinkinase C. Dies führt teilweise zur Aktivierung des intrazellulären Phosphatidylinositol-Signalübertragungsweges.

Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren kommt es zur Stimulation des plasmamembrangebundenen Enzyms Phospholipase C- β . Diese Phospholipase wirkt auf ein Inositolphospholipid, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P₂], welches in der inneren Hälfte der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran zu finden ist. Während die Phospholipase C- β durch das G-Protein G_q aktiviert wird, fungiert G-Protein G_s als Aktivator für die Adenylat-Cyclase. Diese wiederum aktivierte Phospholipase spaltet PI(4,5)P₂. Daraus gehen die zwei Produkte Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin hervor. Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), entstanden durch Hydrolyse-Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P₂], sorgt für eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Cytosol. Eine dagegen unterschiedliche Wirkung wird Diacylglycerin zugeschrieben. Zum einen kann es unter Freisetzung von Arachidonsäure weiter gespalten werden. Arachidonsäure ist als Botenstoff bekannt und kann die Synthese von Eicosanoiden, wie z.B. Prostaglandinen, einleiten. Prostaglandine kommen in allen Organen vor. Sie bewirken unter anderem eine hohe Schmerzempfindlichkeit und spielen bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Eine der wichtigsten Funktionen von

Diacylglycerin ist die Aktivierung der PKC. Der Name dieser Serin/Threonin-Proteinkinase leitet sich von ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit ab. Im aktivierten Zustand wird eine Phosphorylierung zahlreicher Proteine ausgelöst.

Man hat herausgefunden, dass sich die beiden Äste des Signalweges ab der Stufe Inositolphospholipid in intakten Zellen durch bestimmte, pharmakologische Wirkstoffe nachahmen lassen. Phorbolster haben die Eigenschaft, teilweise die Funktion von Diacylglycerin zu übernehmen. Folglich ist die PKC der bekannteste Angriffspunkt des Phorbolsters Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat (Hergenhausen et al., 1991; Krauter et al., 1996; Svetek et al., 1995). TPA hat gegenüber Diacylglycerin den Vorteil, dass es die PKC langanhaltend aktivieren kann. Diacylglycerin liegt dagegen schnell wieder im inaktiven Zustand vor. Warum Phorbolster in der Lage sind, PKC zu aktivieren, ist unter anderem auch auf ihre Lipophilie zurückzuführen. Inaktive und weniger aktiven Phorbolster besitzen kurze Kohlenstoffketten, während die aktiven Formen längere Kohlenstoffketten haben (Wang et al., 2000). Kommt es zur Bindung von TPA an die PKC folgt eine Konformationsänderung des Proteins (Ho et al., 1999). Dies führt wiederum zum Anschalten von Genen, die die Zelldifferenzierung beeinflussen. Mittlerweile ist bekannt, dass Promotoren eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Freisetzung auslösen können (Duran et al., 1991; Ohkawa et al., 1985; Nakamura et al., 1985). Sie sind zudem die Ursache für die Schädigung des umliegenden Gewebes im Bereich von Entzündungen.

Da reaktive Sauerstoffspezies selber tumorpromovierende Eigenschaften aufweisen (Cerutti, 1985; Weitzmann et al., 1985; Wachsmann, 1996; Huang et al., 1999) und als Vermittler der Tumorpromotion dienen, wird angenommen, dass die tumorpromovierende Wirkung des Tetradecanoyl-12,13-Phorbolacetat auf die Bildung von Sauerstoffradikalen zurückzuführen ist. Ist die PKC aktiviert, kommt es in Makrophagen und Keratinozyten über Phosphorylierungsschritte zur Aktivierung der NADPH-Oxidase mit anschließender Freisetzung von Superoxidanionen (Radikalen) in den Extrazellularraum (Curnutte et al., 1994; Cox et al., 1985; Dekker et al., 2000; Reeves et al., 1999). Sauerstoffradikale sind im Prozess der Karzinogenese vielseitig präsent. Sie können die DNS schädigen, indem sie Nukleinsäurebasen modifizieren oder Chromosomenbrüche verursachen. Dies kann entweder zur Apoptose oder zur Karzinogenese führen. Tumorzellen lassen sich dadurch an ihrer hohen Konzentration von Superoxidanionen erkennen. Zusammengefasst zählt TPA zum

stärksten Stimulus der NADPH-abhängigen Superoxidanionen-Produktion. (Cox et al., 1985).

Eine weitere Wirkung des TPA ist die Unterbrechung der Gap-Junctions (Matesic et al., 1994; Ruch et al., 1986 und 1989; Wachsman, 1996). Dies führt zur Aufhebung der Interzellularkontakte. Krebszellen haben dieses charakteristische Merkmal. Ein unkontrolliertes Wachstum und eine vermehrte Teilung der Zellen sind damit möglich.

Erwähnt werden soll auch die chemotaktische Wirkung von TPA auf Makrophagen (Kazaniets et al., 1987), wobei diese an den Ort der Entzündung gelotst werden und die Aufgabe haben, den Entzündungszustand aufrecht zu halten. TPA zeigt nur eine tumorpromovierende Wirkung, wenn es zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion kommt. Phorbolster aktivieren die Neusynthese und Hydrolyse von Phosphatidylcholin und stimulieren die Phospholipase A2 zur Arachidonsäurefreisetzung. (Ohkawa et al., 1985; Yoon et al., 1993). Arachidonsäure wird durch die Enzyme Cyclooxygenase (COX) und Lipxygenase umgesetzt und es entstehen unter anderem Prostaglandine, die die typischen Anzeichen einer Entzündung auslösen. Cyclooxygenase und Lipxygenase spielen bei der Tumorpromotion eine Rolle. Durch rechtzeitige Blockade der COX wird die Entstehung einer Entzündung unterbunden, aber auch eine Tumorpromotion ist nicht mehr nachweisbar. Ebenso lässt sich die tumorpromovierende Wirkung einiger Promotoren durch die gleichzeitige Gabe von Antioxidation unterdrücken, die für den Abbau der Radikale sorgen (Wei et al., 1993; Taniguchi, 1993; Kozumbo et al., 1985; Kuo et al., 1996; Lee et al. 1998; Liu et al., 1993; Nakamura et al., 1999; Ohkawa et al., 1985; Kinzel et al., 1985; Kaul und Khanduja, 1998; Surh et al., 1999; Kensler und Trush, 1984; Zhao et al., 1999; Wolfle und Marquardt, 1996). Die Wirkung von TPA ist reversibel. In den durchgeführten Versuchen konnte beobachtet werden, dass nach vorausgegangener Initiation mit DMBA zunächst Papillome entstanden, die sich unter weiterer Behandlung verstärkt proliferierten und sich zu Karzinomen entwickelten. Wird die Behandlung aber abgebrochen, bilden sich die Papillome wieder zurück.

1.4 Das spinozelluläre Karzinom

Die häufigsten epithelialen malignen Tumore der Haut weltweit sind das Basalzellkarzinom, das spinozelluläre Karzinom (Plattenepithelkarzinom) und das maligne Melanom. Den zweithäufigsten bösartigen Hauttumor mit steigender Inzidenz (20-30 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner) stellt das spinozelluläre Karzinom dar. Diese Krebsart wird auch unter folgenden Synonymen beschrieben:

Plattenepithelkarzinom, Stachelzellkrebs, Spinaliom und SCC (engl. squamos cell carcinoma). In den von uns durchgeführten Versuchen konnten wir die Entwicklung eines spinozellulären Karzinoms mehrfach beobachten.

Auslöser für dessen Entstehung ist die langjährige Belastung durch UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, onkogene humane Papillomen (gutartige Hautwarze, Erkennungsmerkmal: starke Einfaltung der basalen Zellschicht, blumenkohlartige Struktur), chemische Karzinogene (z.B. Steinkohleteer, Paraffinöl und in unseren Versuchen verwendetes DMBA). Kennzeichnend für das Plattenepithelkarzinom der Haut ist dessen Entstehung aus einem initial intraepithelialen Tumor, der klinisch als Präkanzerose oder aktinische Keratose imponiert. Dieser Tumor entwickelt sich aus Zellen (Keratinocyten) der mittleren Schicht der Oberhaut, der Stachelzellenschicht. Durchbrechen diese atypischen epithelialen Tumorzellformationen die Grenze von der Oberhaut zur Lederhaut, kommt es zum Plattenepithelkarzinom. Klinisch lässt sich das folgendermaßen beschreiben. Am Anfang zeigt sich das Plattenepithelkarzinom nur als roter Knoten mit oft schuppender oder verkrustender Oberfläche. Das Abkratzen dieser Hornschicht kann zu einer blutenden Wunde führen. Im weiteren Verlauf entwickelt sich das SCC zu einem harten und schmerzlosen Knoten. Mit der Zeit kann die Oberfläche des Tumors ein warzenähnliches Aussehen erhalten. Der Tumor wächst stetig, bildet Geschwüre mit zunehmender Verletzung benachbarter Gewebe und kann lymphogen und hämatogen metastasieren. Die Heilungschancen von Frühformen des spinozellulären Karzinoms sind relativ gut. Tumore im fortgeschrittenen Stadium sind schwerer therapierbar und neigen oft zu Rückfällen. Eine frühzeitige Erkennung dieser Krankheit verspricht Hoffnung auf Heilung und um ein Fortschreiten dieser Krankheit zu verhindern, ist es wichtig die Pathogenese des spinozellulären Karzinoms zu erforschen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von spinözellulären Karzinomen der Haut. Einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von spinözellulären Karzinomen haben Fehlregulationen von Wachstum und Differenzierung der Keratinozyten. Um solche pathologischen Vorgänge genauer charakterisieren zu können, sind Kenntnisse von den in der Oberhaut (Epidermis) stattfindenden Regulationsprozessen von Keratinozyten bedingt durch schädigende Einflüsse sehr wichtig. In dieser Arbeit legten wir den Schwerpunkt auf die Untereinheit RelA (p65) des Transkriptionsfaktors NF- κ B und wollten den Einfluss auf die Entstehung von epithelialen Tumoren der Haut untersuchen. Hierzu wurden für die Versuche Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 zum Vergleich herangezogen, die zum einen das Gen für die Codierung von RelA im Genom enthielten und zum anderen die, bei denen das Gen für die transaktivierende Untereinheit RelA (p65) des Transkriptionsfaktors NF- κ B spezifisch in den Keratinozyten deletiert wurde.

Nach dem Maushautmodell der Mehrstufenkarzenogenese, siehe Abbildung 1.2, sollte ein Tumor auf der Haut der Maustiere induziert werden. Als Tumorigenitor für unsere Versuche diente DMBA. TPA sollte als Tumorigenitor und Aktivator des klassischen NF- κ B-Signaltransduktionsweg eingesetzt werden, der zwei- bis dreimal die Woche und mit unterschiedlicher Konzentration auf die Haut appliziert wurde. Durch Beobachtungen der Haut ein- bis zweimal die Woche sollte die Entwicklung von Tumoren, deren Anzahl und Größe dokumentiert werden. Als Negativkontrolle diente die Behandlung der Haut mit Azeton. Die Versuchsdauer wurde auf 20-30 Wochen festgelegt.

Die Durchführung von histochemischen Färbungen diente dem Nachweis der aktivierten bzw. inaktivierten Form von RelA, IKK α / β und c-Jun im Hautgewebe.

Zur Erfüllung der Aufgabenstellung sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Rolle spielt die Untereinheit RelA des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von spinözellulären Karzinomen der Haut?
- Welche Auswirkung hat die Erhöhung der Applikationsfrequenz und Konzentration von TPA bei der Entstehung von Tumoren?
- Welchen Einfluss haben andere Komponenten von Signaltransduktionswegen, wie IKK α / β und c-Jun in diesem Zusammenhang?

Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu Regulationsmechanismen in normalen und bösartigen Hautzellen könnten Ansätze für verbesserte, gezielte antitumorale Therapien liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Azeton		Sigma
Agarose		Invitrogen
Agarosegel, 2%ig 3,2 g Agarose auf 160 ml TAE-Puffer 1fach		
Chloroform		Sigma
Ethanol, 100 %		Sigma
Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml		Sigma
DNS-Standard 1 kb-Ladder		Gibco
Formalin		
DMBA (7,12-Dimethylbenzanthracen) Protokoll 1 u. 2: $c=0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$		Sigma
TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) Aufbewahrung: lichtgeschützt bei -20°C Protokoll 1: $c=0,025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Protokoll 2: $c=0,062 \mu\text{g}/\mu\text{l}$		Sigma
Gelladepuffer: 100ml		
0,05 % Bromphenolblau	0,05 g	Sigma B-5525
0,05 % Xylene Cyanol	0,05 g	Sigma X-4126
15 % Fycoll Typ 400	15 g	Pharmacia 17-0400-01

Phenol/Chloroform-Lösung

Sigma

10 x PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O	2,76 g
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	14,24 g
NaCl	76 g
DEPC-H ₂ O	1 ml

Primer für Genotypisierung

Cre I (k5 cre): 5`-CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG-3`

Cre II (k5 cre): 5`-CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG-3`

p65-1: 5`-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3`

p65-2: 5`-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3`

p65-loxPneo 5`-ACT GAA GCG GCC AGG ATG-3`

Magnesiumchlorid

Merck

Verdaulösung

TNE	500 µl
SDS 10 %	50 µl
Proteinase K	7,5 µl
Protease	25 µl

TNE

10 mM Tris 8,0	1 M	10 ml
100 mM NaCl	5 M	20 ml
1mM EDTA	0,5 M	2 ml

SDS 10%

SDS	50 g
ddH ₂ O	ad 500ml

Sigma

Proteinase K (10 mg/ml)

Proteinase K 125 mg

Sigma

DEPC-H₂O 3.125 ml

4 Std. bei 37°C vorverdauen

Protease (Pronase E) (10 mg/ml)**TE**

10 mM Tris 8,0 1 M 100 µl

1 mM EDTA 0,5 M 2 µl

50x TAE-Stammlösung

Tris 242 g

Eisessig 57,1 ml

0,5 M EDTA, pH 8,0 100 ml

dd H₂O ad 1000 ml

Antibody Diluent

Zytomed Systems

2.2 Antikörper

Antikörper für die Histologie/Immunhistologie mit Verdünnungsverhältnis:

- NF-κB p65 (A):sc-109, Source: Rabbit, Santa Cruz (1 : 200)
- Phospho-NF-κB p65 (Ser276), Source: Rabbit, Lab Vision (1 : 25)
- Phospho-NF-κB p65 (Ser435), Source: Rabbit, Lab Vision (1 : 10)
- Phospho-NF-κB p65 (Ser468), Source: Rabbit, Lab Vision (1 : 10)
- Phospho-IKK α/β (Ser176/180), Source: Rabbit, Cell Signaling (1 : 5)
- IKK α/β (H-470): sc-7607, Source: Rabbit, Santa Cruz (1 : 100/200)
- Phospho-c-Jun (Ser73), Source: Rabbit, Cell Signaling (1 : 10)
- c-Jun (H-79): sc-1694, Source: Rabbit, Santa Cruz (1 : 300)

2.3 Für die Versuchsreihen verwendete Mausstämme

Mäuse, die für unsere Untersuchungen herangezogen worden, hatten den genetischen Hintergrund C57BL/6. Zur Erzeugung der transgenen Mäuse *RelA*^{k5Δ/k5Δ} (Knockout) wurden die Mäuse mit einem von loxP-Boxen flankierten *RelA* Gen (*RelA*^{f/f} „floxed allele“) mit Deleter-Cre Mäusen verpaart (Schwenk et al., 1995).

Die Cre-Expression wird durch einen Keratinozyten-spezifischen Keratin-5-Promotor kontrolliert (Tarutani et al., 1997). Promotoren sind bestimmte Nukleotid-Sequenzen der DNS, zu deren wichtigen Eigenschaften die spezifische Wechselwirkung mit bestimmten DNS-bindenden Proteinen ist. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription eines Gens.

Sobald die Cre-Rekombinase aktiviert ist, katalysiert diese die Rekombination zwischen den loxP Sequenzen. Die Rekombination ist ein durch spezielle Enzyme (Rekombinasen) katalysierender Prozess, bei dem eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNS-Abschnitten erfolgt. In diesem Fall kommt es zu einer zelltyp-spezifischen Exzision des durch loxP Sequenzen flankierten Exons (*RelA*-Gen) mit anschließender Geninaktivierung.

2.4 Zucht der Mäuse

Für die Züchtung von Mäusen wird ein Weibchen im gebärfähigen Alter (8-40 Wochen) mit einem Männchen (8-40 Wochen) zur Paarung zusammengesetzt. Sind die Nachkommen 3-7 Tage alt, dann erfolgt die Genotypisierung mittels PCR durch DNS aus dem Schwanzgewebe der Maus. Für den weiteren Zuchtablauf ist es wichtig, dass die Jungtiere von ihren Eltern nach 3 Wochen getrennt und nach Geschlechtern sortiert werden.

2.5 PCR als Methode zur Genotypisierung der Mäuse

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) stellt eine schnelle und einfache Methode dar, um unbegrenzte Kopien verschiedener DNS Fragmente zu erzeugen. Für diesen Vorgang spielt eine hitzestabile DNS-Polymerase (Taq-Polymerase), die in extrem thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*) vorkommt, eine entscheidende Rolle.

Sie verdoppelt die DNS vor der Zellteilung, indem sie an einen einzelnen DNS-Strang bindet und einen dazu komplementären Strang konstruiert.

Wie bereits erwähnt, findet die PCR ihren Einsatz, um einen genau definierten Teil eines DNS-Stranges zu vervielfältigen. Anhand dieser Methode konnten wir Wildtyp-Mäuse von Mäusen mit Mutationen im *RelA*-Gen unterscheiden. Wir sind folgendermaßen vorgegangen.

Aufreinigung von Tails

Das zu untersuchende Material (Schwanzspitzenbiopsie/Tail) wurde für die Isolierung genomischer DNS in dem unten beschriebenen Puffer über Nacht im Thermoblock bei 56°C (5-12 Stunden) inkubiert.

Zusammensetzung des Puffers für die Verdauung von Mausschwanzbiopsien

TNE	500 µl
SDS 10 %	50 µl
Proteinase K	7,5 µl
Pronase E	25 µl

Nach der Inkubation wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion durchgeführt. Diese dient der Beseitigung proteinhaltiger Verunreinigungen. Hierbei werden 500 µl des Gemisches Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis von 25:24:1 ins Tube hinzugegeben. Nach einem kurzen Schüttelvorgang wird diese Mischung bei 14000U 5 Minuten zentrifugiert. Eine Phasentrennung wurde vollzogen. Jetzt konnte die obere, wässrige DNS enthaltene Phase (450-500 µl) vorsichtig abgenommen und in ein neues Tube überführt werden. Um eine genaue Phasentrennung herbeizuführen, wird nochmals zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube pipettiert. Dazu wird 100%iger Ethanol (gelagert bei -20°C, Verhältnis zur Probenmenge ca. 1:2) gegeben, kräftig geschüttelt und abermals bei 14000U 5 min. zentrifugiert. Es kommt zum Ausfällen der DNS, die dann nach Abgießen des Alkohols mit ca. 400-500 µl erkalteten 70%igen Ethanol gewaschen wird. Nach dem Zentrifugieren wird der Alkohol mit der Pipette entnommen. Bei Raumtemperatur lässt man den restlichen Alkohol verdampfen. Zum Schluss wird die DNS in TE-Puffer (40-80 µl) gelöst und entweder bei Raumtemperatur eine Stunde

stehen gelassen oder 10 Minuten in einem Thermoblock bei 37°C gestellt. Die gewonnene Probe kann für die PCR eingesetzt werden.

2 µl dieser Probe (DNS) werden in ein auf Eis gelagertes Tube überführt und der Mastermix für die PCR dazu gegeben.

Um eine enzymatische Vermehrung eines definierten DNS-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern vollziehen zu können, ist die Wahl der Primer von entscheidender Bedeutung.

Wir haben uns für folgende Zusammensetzung entschieden:

Mastermix

MgCl ₂	5 µl
dNTPs (dATP, dGPT, dTTP, dCTP, 1mMol/µl	10 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	29 µl
Taq-DNS-Polymerase	1 µl

Die oben erwähnte 2 µl Probe enthält die DNS mit dem zu vervielfältigenden Abschnitt. Zwei Primer dienen zur Festlegung von Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnittes.

Für unsere Arbeit wurden folgende Primer eingesetzt:

Cre I (K5 cre): 5`-CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG-3`

Cre II (K5 cre): 5`-CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG-3`

p65-1: 5`-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3`

p65-2: 5`-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3`

p65-loxPneo: 5`-ACT GAA GCG GCC AGG ATG-3`

Die DNS-Polymerase hat die Aufgabe, einen definierten bestimmten Abschnitt zu replizieren und sie muss eine hohe Thermostabilität aufweisen. Man gewinnt sie aus *Thermophilus aquaticus* und bezeichnet sie auch als Taq. Nukleotide, die dNTPs, stellen die Bausteine für den synthetisierten Strang dar.

Gute Bedingungen für die Funktion der DNS-Polymerase werden durch eine geeignete Pufferlösung sichergestellt.

Das Gesamtreaktionsvolumen der PCR beträgt 49 µl. Um das Verdunsten von Volumen zu verhindern, wird noch ein Tropfen Mineralöl auf die Proben gegeben und verschlossen in den PCR-Thermocycler gestellt.

Damit sind alle Voraussetzungen für den PCR-Prozess geschaffen, der meist aus 20 bis 40 Zyklen von 5 Schritten besteht:

Schritt (1): Initiale Denaturierung (Trennung der DNS Stränge)

Schritt (2): Denaturierung (Trennung der DNS Stränge)

Schritt (3): Annealing (Anlagerung der DNS Stränge)

Schritt (4): Polymerisation/Elongation

Schritt (5): Finale Polymerisation

Kurz zusammengefasst erhitzt man die doppelsträngige DNS auf 94°C, um eine Trennung der Stränge zu vollziehen. Dabei kommt es zum Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen, die für den Zusammenhalt der beiden DNS-Stränge verantwortlich sind. Man verlängert den Vorgang des Erhitzens, um eine möglichst vollständige Trennung der Einzelstränge zu erzielen. Anschließend wird die Temperatur wieder gesenkt, damit sich die Primer an die einzelnen DNS-Stränge anlagern können. Die gewählte Temperatur richtet sich nach den verwendeten Primern. Eine falsch verwendete Temperatur kann die Ursache für das Anlagern der Primer an einer falschen Stelle innerhalb der Einzelstränge sein. Im nächsten Schritt erfüllt die DNS-Polymerase ihre Aufgabe, indem sie die Einzelstränge mit Nukleotiden auffüllt. Man spricht auch von Elongation. Am Ende des Prozesses liegen mehrere komplementäre DNS-Stränge vor.

Verwendete PCR-Programme:

Primer 1: Cre I (K5 cre): 5`-CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG-3`

Primer 2: Cre II (K5 cre): 5`-CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG-3`

(1) 94°C	(2) 94°C	(3) 60 °C	(4) 65°C	(5) 65°C	4°C
2 min	3 min	40 s	1 min 30 s	5 min	24 Std.

Primer 1: p65-1: 5`-GAG CGC ATG CCT AGC ACC AG-3`

Primer 2: p65-2: 5`-GTG CAC TGC ATG CGT GCA G-3`

(1) 94°C	(2) 80°C	(3) 94 °C	(4) 61°C	(5) 72°C	4°C
5 min	10 min	1 min	30 s	1 min 30 s	24 Std.

Zur Auswertung der PCR wurde die Agarose-Gelelektrophorese herangezogen. Hierbei werden die DNS-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden. Zur Herstellung des 1-2 %igen Agarosegels wurden 0,5-1g Agarose mit 50ml 1 x TAE vermischt und nachfolgend im Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis das Gel klar und schlierenfrei war. 23µl Probe wurden dann mit 6-7µl Gelladepuffer vermischt und in eine Gelkammer gefüllt.

Folgende Elektrophorese-Laufbedingungen wurden gewählt:

100-120 V für 30-45 min.

Die DNS-Auftrennung konnte durch Färbung des Agarosegels mit Ethidiumbromid unter Verwendung eines UV-Transilluminators (Gel Doc, Bio-Rad) visualisiert werden.

Die zu erwarteten Größen der DNS-Fragmente sind bei der Cre-PCR 615 bp, bei der p65-PCR 260 bp für das Wildtyp Allel und 294 bp für das *RelA*-Allel. Das deletierte Allel zeigt eine Bandengröße von 400 bp.

2.6 Trennung von Keratinozyten und Fibroblasten

Die abgezogene Haut der Mäuse wurde mit Jodobac® und 100%igen Ethanol desinfiziert. Anschließend folgte ein Waschvorgang mit PBS. Vorsichtig wurde danach das Fett- und Bindegewebe entfernt. Über Nacht wurde die Haut mit der dermalen Seite nach unten in eine 2,5%ige Trypsin/PBS/EDTA-Lösung bei 4°C eingelegt. Am nächsten Tag konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen werden. Die beiden getrennten Hautschichten wurden mit dem Skalpell in kleinste Fragmente geschnitten und in einem Zellsieb (platziert in einer Petrischale) gegeben. Durch Zugabe von 3-4 ml PBS und Zerdrücken mit Hilfe eines

Spritzkolbens wurde eine Zellsuspension gewonnen. Diese wurde anschließend bei 1500U 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und es schlossen sich zwei weitere Zentrifugievorgänge an. Der gewonnene Rückstand wurde nun mit der oben beschriebenen Verdauungslösung versetzt und weitere Schritte bis zur PCR folgten wie bereits oben erwähnt.

2.7 Protokolle für die Durchführung der Versuchsreihen

Die durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern mit der Nummer Gz. 55.2-1-54-2532-90-07 genehmigt.

2.7.1 Protokoll 1/2

Verwendete Tiere

Die verwendeten Tiere mit dem genetischen Hintergrund *RelA*^{k5Δ/k5Δ} und C57BL/6 sind zu Beginn des Versuches 6-7 Wochen alt.

Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgt unter SPF-Bedingungen in einem Isolator mit Sicherheitsablufteinrichtung. Je 1-5 Tiere werden in einem Käfig gehalten.

Protokoll der Hautkarzinogenese

Die DMBA/TPA-Mehrstufenkarzinogenese der Mauhaut erfolgt mit einigen Modifikationen gut etablierter Protokolle [siehe Fürstenberger u. Kopp-Schneider, 1995, Carcinogenesis]. Die Applikation der Chemikalien erfolgt topisch/epikutan auf die Rückenfläche der Maus mit Hilfe einer Pipette:

a) Initiation: Protokoll 1 und 2

Behandlungsstart, in der ersten Woche erfolgt eine einmalige Applikation von 200 µl DMBA (c=0,25 µg/µl) in Azeton auf die Rückenhaut der Versuchstiere. Die Kontrolltiere werden jeweils mit 200 µl Azeton behandelt.

b) *Promotion*: Protokoll 1

Eine Woche nach der Initiation beginnt die 2x wöchentliche Applikation (montags und donnerstags) von 200 µl TPA ($c=0,025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in Azeton. Die Kontrollgruppen werden jeweils mit 200 µl Azeton behandelt.

Protokoll 2

Eine Woche nach der Initiation beginnt die 3x wöchentliche Applikation (montags, mittwochs und freitags) von 200 µl TPA ($c=0,062 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) in Azeton. Die Kontrollgruppen werden jeweils mit 200 µl Azeton behandelt.

Für die Behandlungsdauer sind 20 bis 30 Wochen vorgesehen. Ein- bis zweimal pro Woche werden die Tiere genauer beobachtet und auftretende Veränderungen (z.B. die Papillomanzahl pro Tier) werden notiert. In der ca. 30.-50. Woche erfolgt die Tötung der Tiere. Tumore und sonstige Gewebe werden für weitere Untersuchungen konserviert.

2.8 Histologische und immunhistochemische Verfahren

2.8.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die entnommenen Hautproben wurden für ca. einen Tag bei 4°C in Formalin/PBS fixiert. Wenn erforderlich wurden die Proben entsprechend zugeschnitten und über Nacht in den Entwässerungsapparat gegeben.

Während dieses Zeitraumes erfolgt ein Entwässerungsprozess des Gewebes mit verschiedenen Reagenzien:

- Formalin für 2 Std. bei 40°C
- 70%iges Ethanol für 30 min
- 70%iges Ethanol für 1 Std.
- 90%iges Ethanol für 1 Std.
- 90%iges Ethanol für 1 Std.
- 100%iges Ethanol für 1 Std.
- 100%iges Ethanol für 1 Std.
- 100%iges Ethanol für 2 Std.
- Xylol für 2 Std.

- Xylol für 1 Std.
- Paraffin für 1 Std. bei 62 °C
- Paraffin für 1 Std.
- Paraffin für 1 Std.
- Paraffin für 1 Std. und 30 min Programmende

Anschließend wurde die Gewebeprobe in Paraffin (Tissue-Embedding-Medium) bei 56 °C eingebettet und abgekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms konnten danach Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 0,5 - 2 µm erstellt werden, die auf einen Objektträger aufgetragen wurden.

2.8.2 HE-Färbungen

Wie bereits oben beschrieben, wurden die Gewebeproben für ca. 24 Stunden in 4%igen Formalin/PBS fixiert, in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Danach kann die HE-Färbung erfolgen. Man taucht die Gewebeschnitte 1 - 3 Minuten in Harrys Hämatoxylin und man spült die Objektträger kurz mit Wasser ab.

Nacheinanderfolgende Inkubationsschritte folgen:

- 30%iges Ethanol für 30 s
- 70%iges Ethanol für 30 s
- Eosin (Eosin Y Solution, Sigma) für 5-15 s
- 70%iges Ethanol für 30 s
- 90%iges Ethanol für 30 s
- 100%iges Ethanol für 1 min
- Xylol für 1 min

Man tropft anschließend das Einschlussmittel Corbit-Balsam auf die Gewebeprobe. Die Präparate können dann unter dem Mikroskop beobachtet werden, nachdem sie mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt wurden.

2.8.3 AEC-Färbung

2.8.3.1 Puffer und Lösungen

EZ-DeWax Solution

zum Entparaffinieren 100 ml DeWax Konzentrat
90 ml vergällten Alkohol 96%

EDTA-Puffer

2 ml 0,5 M EDTA pH 8 in 1l Aqua dest. lösen
pH auf 8,0 einstellen

Citratpuffer

Lsg. A: 5,24 g Citronensäure/250 ml Aqua dest.
Lsg. B: 14,7 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat/
500 ml Aqua dest.
Herstellung: 18ml Lsg.A und 82 ml Lsg. B in 1 l
Aqua dest. lösen
pH auf 6,0 einstellen

0,3%ige Hydrogen Peroxide Lösung

30%ige Wasserstoffperoxidlsg.
(Sigma) mit Aqua dest.
1:10 verdünnen

PBS-Puffer

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)
0,24 g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)
Herstellung: Salze einwiegen mit ca. 1 l Aqua dest.
auffüllen, den pH 7,4 einstellen

Ultra-V-Block

(LabVision)

N-Histofine

Immunohistochemical staining reagent
(Nichirei Biosciences)
Universal Immuno-peroxidase Polymer for
Mouse tissue sections Anti-Rabbit primary antibody

AEC-Substratsystem (LabVision) AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol

bestehend aus: AEC-Substrat
 AEC- Chromogen

Herstellung: 20 µl AEC-Chromogen werden zu
 1 ml AEC-Substrat hinzugegeben und vermischt

Hämalaun Reagenz:

1 g Hämatoxilin in 1000 ml Millipore lösen, danach genau
hinzufügen: 0,2 g Natriumjodat
 50,0 g Aluminiumkaliumsulfat (Kalialaun)
 1,0 g Zitronensäure

Kaisers Glyceringelatine

Antibody Diluent Zytomed Systems

2.8.3.2 Protokoll Färbemethode

Zunächst mussten die Antikörper auf Mausgewebe etabliert werden, da das angegebene Verdünnungsverhältnis sich oft auf humanes Gewebe bezog. Auch war nicht jede Färbetechnik für das Färben von Mausgewebe geeignet. Es wurden mehrere Verfahren ausgetestet und es konnten mit folgender Färbemethode zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden. Der erste Arbeitsschritt ist die Entparaffinierung. Dies erfolgte mit DeWax Solution, worin die Schnitte zweimal je 5 Minuten getaucht wurden. Es schließt sich ein sechsmaliger Waschvorgang mit Leitungswasser an. Danach werden die Schnitte in Citrat- oder EDTA-Puffer für ungefähr 10 Minuten gekocht. Die Wahl des Puffers richtet sich nach dem verwendeten Antikörper. Es wurde festgestellt, dass dadurch die Intensität der Färbung des Hautgewebes beeinflusst werden kann.

Nach dem Kochvorgang müssen die Schnitte für 10 Minuten abkühlen. Anschließend wird wieder mit Leitungswasser gespült und das restliche Wasser auf dem Objektträger vorsichtig mit einem trockenen Tuch abgewischt. Danach werden die Schnitte für 15 Minuten in 0,3%igen Hydrogen Peroxidase Lösung inkubiert. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Quenching und er dient zum Blocken der

endogenen Peroxidase. Es verhindert unspezifische Bindungen des Antikörpers. Anschließend wird viermal mit Puffer gewaschen. Als nächstes wird der Ultra V Block aufgetragen. Er dient dazu, die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Die Inkubation ist für 5 Minuten angesetzt. Es wird darauf hingewiesen, dass die Gewebeschnitte nicht länger als 10 Minuten inkubieren sollen, da sonst eine Reduktion der gewünschten Färbung auftreten kann. Bevor der Primärantikörper aufgetragen wird, muss man den Waschvorgang mit PBS-Puffer viermal durchführen. Die Gewebeschnitte werden über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag werden die Gewebeschnitte wieder mit Puffer gewaschen. Histofine-Reagenz wird aufgetragen und es wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Ein letztes Mal wird mit PBS-Puffer viermal gewaschen. Nun wird der AEC-Mix aufgetragen, welcher nach 20 Minuten Inkubation ein rotes Endprodukt erzeugt. Die Objektträger werden mit destilliertem Wasser abgespült und mit Hämalun rückgefärbt. Für 5 Minuten erfolgt das Bläuen der Zellkerne. Schließlich werden die Objektträger mit einem Tuch trocken gewischt und die Gewebeschnitte in wässrigem Eindeckmedium, Kaisers Glyceringelatine, eingedeckt. Für die Negativkontrollen wurden die Schnitte anstatt mit dem Primärkörper nur mit der entsprechenden Pufferlösung, PBS, inkubiert.

3 Ergebnisse

3.1 Beobachtungen und Auswertung der Versuchsreihen bezogen auf die Behandlung mit TPA zwei- bzw. dreimal pro Woche

Das Zusammenstellen der Versuchsreihen hinsichtlich der Anzahl der Tiere wurde mit dem STABLAB der LMU München besprochen. Zu einer Versuchsreihe gehörten immer Versuchs- und Kontrolltiere einer Mauslinie. Es wurde darauf geachtet, dass die Anzahl der Versuchs- und Kontrolltiere nahezu gleich war und dass sich beide Gruppen sowohl aus männlichen als auch weiblichen Maustieren zusammensetzten. Zur Gruppe der Versuchstiere gehörten die Mäuse, die in der ersten Woche den Tumorinitiator DMBA (7,12-Dimethylbenzanthrazen) in einer Konzentration von 0,25 µg/µl einmal auf die Rückenhaut aufgetragen bekommen haben und bei denen in der darauffolgenden Woche eine Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-azetat), auch unter der Bezeichnung PMA (Phorbol-12-myristat-13-azetat) bekannt, zwei- bis dreimal pro Woche in unterschiedlicher Konzentration erfolgte. Unter Kontrolltiere versteht man die Gruppe der Mäuse, die anstelle von DMBA und TPA mit Azeton nach dem oben beschriebenen Behandlungsschema behandelt wurden. Azeton wurde als Lösungsmittel für DMBA und TPA verwendet. Das Auftragen von Azeton auf die Rückenhaut diente der Beobachtung von Hautveränderungen, die nicht auf DMBA und TPA zurück zuführen sind.

Bei den Versuchen wurden zwei Mauslinien miteinander verglichen. Wir verwendeten zum einem die Linie *RelA*^{k5Δ/k5Δ} mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6. Bei Mäusen mit dieser Mutation, wurde das Gen, das RelA (p65) codiert, in der Epidermis der Haut deletiert. Als Vergleich wurde eine Wildtyp-Maus mit dem gleichen genetischen Hintergrund C57BL/6 eingesetzt. Beide Mauslinien wurden mit den gleichen Reagenzien und deren jeweiligen Konzentrationen behandelt, wie es unter dem Punkt 2.7 „Protokolle für die Durchführung der Versuchsreihen“ beschrieben wird. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationsfrequenz und Konzentration des Tumorpromotors haben wir die Versuchsreihen nochmals unterteilt. Im Gegensatz zu den Mäusen der Versuchsreihen A-C, denen zweimal wöchentlich TPA in einer Konzentration von 0,025 µg/µl appliziert wurde, erhielten die Mäuse der Versuchsreihen X 1-4 dreimal wöchentlich TPA mit einer erhöhten Konzentration von 0,062 µg/µl, um herauszufinden, was für eine Auswirkung die Erhöhung der Applikationsfrequenz und Konzentration von TPA auf die Entstehung

von Tumoren hat. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.22 zeigen eine Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen (VR) und deren Aufbau.

Versuchsreihe A 1 Linie: RelA ^{k5Δ/k5Δ} Start: 03.11.2005 Versuchstiere: 5♀, 2♂ Kontrolltiere: 3♀, 3♂ Ende der Versuchsreihe: 20.10.2006 (49. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 34. Woche	Versuchsreihe A 2 Linie: C57BL/6 Start: 22.12.2005 Versuchstiere: 5♀, 2♂ Kontrolltiere: 3♀, 3♂ Ende der Versuchsreihe: 09.11.2006 (46. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 32. Woche
Versuchsreihe B 1 Linie: RelA ^{k5Δ/k5Δ} Start: 30.01.2006 Versuchstiere: 2♀, 4♂ Kontrolltiere: 2♀, 3♂ Ende der Versuchsreihe: 21.12.2006 (46. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 26. Woche	Versuchsreihe B 2 Linie: C57BL/6 Start: 30.01.2006 Versuchstiere: 2♀, 4♂ Kontrolltiere: 2♀, 3♂ Ende der Versuchsreihe: 21.12.2006 (46. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 26. Woche
Versuchsreihe C 1 Linie: RelA ^{k5Δ/k5Δ} Start: 29.01.2007 Versuchstiere: 5 ♂ Kontrolltiere: 4 ♀ Ende der Versuchsreihe: 11.08.2007 (29. Woche) Die Versuchsreihe wurde vorzeitig abgebrochen Aufgrund eines kompletten Ausfalls der Versuchstiere.	Versuchsreihe C 2 Linie: C57BL/6 Start: 29.01.2007 Versuchstiere: 2 ♂ , 3 ♀ Kontrolltiere: 3 ♀ , 1 ♂ Ende der Versuchsreihe: 19.11.07 (42. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 34. Woche

Abbildung 3.1: Aufbau der Versuchsreihen A-C, Applikation mit TPA erfolgte 2x pro Woche

3.1.1 Beobachtungen und Auswertung der Versuchsreihen A-C

Bei der Durchführung dieser Versuche galt es herauszufinden, welche Rolle die Untereinheit RelA (p65) des Transkriptionsfaktors NF-κB bei der Entstehung von Hauttumoren spielt. Die Induktion von Tumoren bei den zum Vergleich herangezogenen Mauslinien, wie oben beschrieben, erfolgte durch die zweimalige Applikation von TPA pro Woche. Um die erhaltenen Ergebnisse der ersten Versuchsreihe bestätigen zu können, wurden zwei weitere Versuchsreihen mit ähnlichen Aufbau und wie im Protokoll beschrieben durchgeführt.

3.1.1.1 Versuchsreihe A 1

Ab der zweiten Behandlungswoche waren leichte Entzündungen der Haut bei den Versuchs- und Kontrolltieren erkennbar. Im Laufe der nächsten Wochen konnte speziell bei den mit TPA behandelten Mäusen eine schuppige und verkrustete Haut beobachtet werden. Auffällig war auch ein verstärkter Fellausfall an der Applikationsstelle. Während bei den Versuchstieren in relativ kurzer Zeit deutliche Veränderungen der Haut festgestellt werden konnten (Abbildung 3.2 und Abbildung

3.3) war dagegen die Haut der Kontrolltiere, die mit Azeton behandelt wurden, eher unauffällig. Gelegentlich konnten ein lichtetes Fell oder Fellausfall notiert werden. Ab der 16. Woche wurden zum ersten Mal bei zwei von sieben mit TPA behandelten Mäusen Anzeichen für die Entstehung von Papeln beobachtet. Papeln sind in der Dermatologie Verdickungen der Haut mit einem Durchmesser von weniger als 5 mm. Sie entstehen durch die Vermehrung von Zellen in der Horn- oder Stachelzellschicht der Epidermis und können sich zu gutartigen Tumoren (Papillome) bis hin zu bösartigen Tumoren (spinozelluläre Karzinome) entwickeln. In den darauf folgenden Wochen konnte man sehen, wie es verstärkt zum Wachstum von Papeln kam. Auffällig war die Entwicklung dieser Papeln bezüglich ihrer Größe und Anzahl. Diese Beobachtungen werden in einem der nächsten Abschnitte zusammenfassend präsentiert.

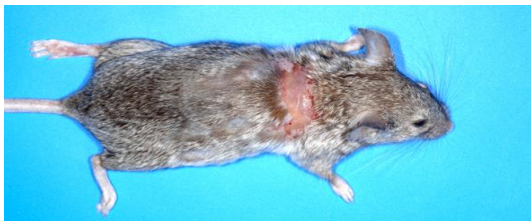


Abbildung 3.2: Transgene Maus (Linie: *RelA*^{k5Δ/k5Δ}), Wunde, entzündete Haut, 29 Wochen mit TPA behandelt

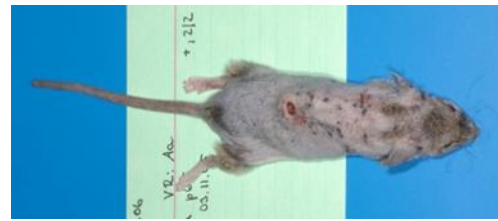


Abbildung 3.3: Transgene Maus (Linie: *RelA*^{k5Δ/k5Δ}), Entzündung der Haut, Fellausfall, 15 Wochen nach Ende der TPA-Behandlung

Neben der Entstehung von Papeln wies die Haut verstärkt Reizungen und Rötungen auf. An vereinzelt Stellen der Haut kam es vermehrt zur Schuppenbildung. Ab der 19. Behandlungswoche mit TPA bildeten sich bei einer Maus gleich mehrere Papeln heraus. Eine andere Maus dieser Versuchsreihe wies eine starke Entzündung im Nackenbereich auf. Die Haut war stark gerötet, sie nässte zum Teil und es traten vereinzelt Blutungen auf. In den darauffolgenden Wochen kam es zu einem stetigen Wachstum der Papeln. Auch deren Anzahl pro Maus nahm zu. Bis zu zehn Papeln konnten bei einer Maus gezählt werden.

Im weiteren Verlauf des Versuches nahmen auch die Hautentzündungen zu. Mäuse, die vermehrt Papeln auf der Haut ausbildeten, verloren an Gewicht und waren körperlich schwach. Eine davon verstarb bereits noch vor Ende des Versuches. Bei einigen Mäusen konnte man auch beobachten, dass einzelne Papeln zusammenwuchsen und sich zu einem großflächigen Tumor entwickelten. Die Hautoberfläche präsentierte sich optisch als verkrustete Schicht.

In Woche 34 wurde die Behandlung mit TPA beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten sich mehrere Papeln, variierend in Größe und Anzahl, bei den Mäusen

herausgebildet. Nach Abschluss der TPA-Behandlung beobachteten wir die Entwicklung der Papeln weiter und beim Ermitteln der Größe stellte sich heraus, dass diese sich teils wieder verkleinerten. Durch den Abbruch der Behandlung mit dem Tumorpromotor auf die Haut ließ das Zellwachstum nach. Nach einer Behandlungsdauer von 34 Wochen mit Azeton bei den Kontrolltieren war deren Haut an der Auftragsstelle gereizt und es kam teilweise zum Fellausfall.

Zusammenfassende Darstellung von VR A 1:

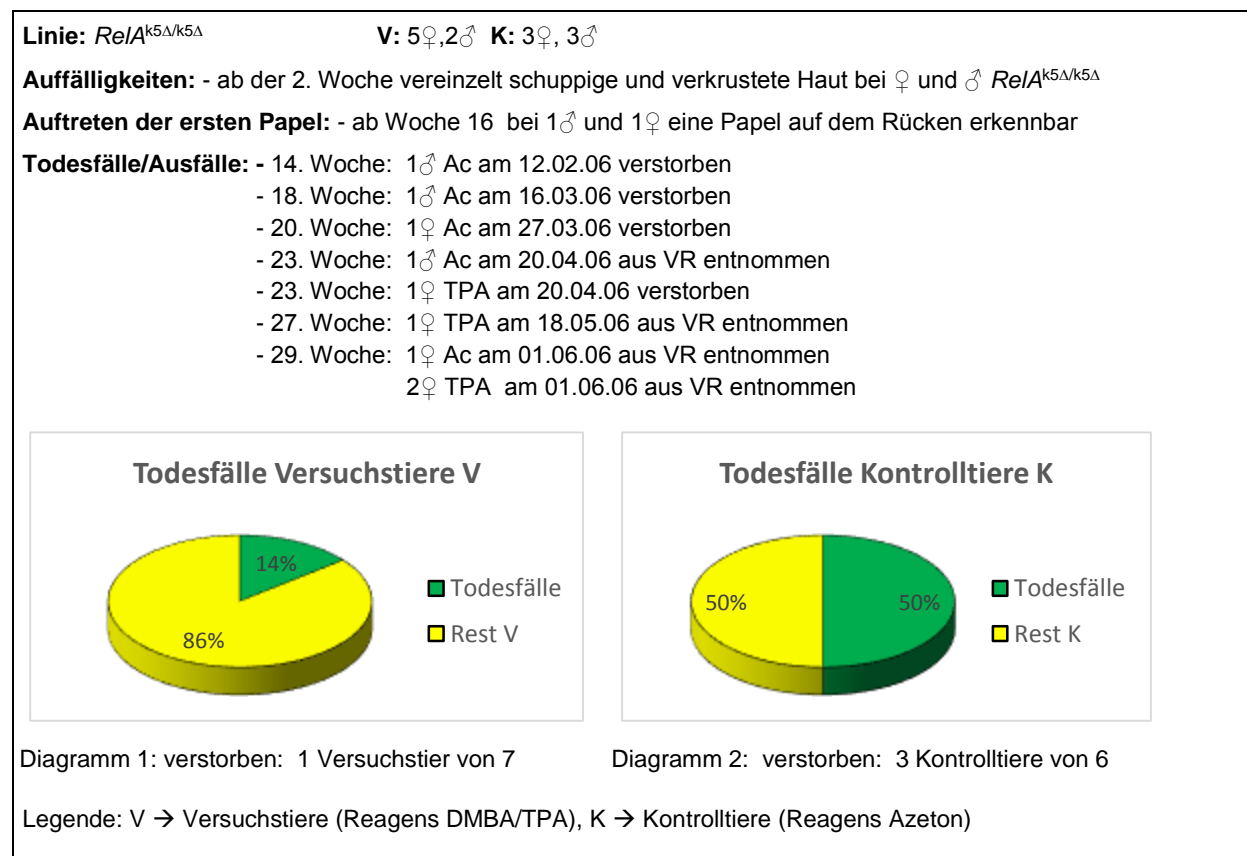


Abbildung 3.4: Zusammenfassung Versuchsreihe A 1, Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$

3.1.1.2 Versuchsreihe A 2

In den ersten Wochen der TPA-Auftragung auf die Haut nahm sowohl bei den Versuchstieren als auch bei den Kontrolltieren die Dichte des Fells ab. Erstmals wurde in der 10. TPA-Behandlungswoche eine Papel bei einer Maus festgestellt. Drei Wochen später war diese geringfügig gewachsen. Dagegen konnte eine weitere Papel bei einer anderen Maus beobachtet werden, bei der ein schnelleres Wachstum innerhalb von 2 Wochen zu verzeichnen war. In den nächsten Wochen stieg auch die

Anzahl der Papeln pro Maus an. Wir konnten in der 21. Woche der TPA-Behandlung einen Knoten mit einem Durchmesser von 1,4 cm (Abbildung 3.5) beobachten.

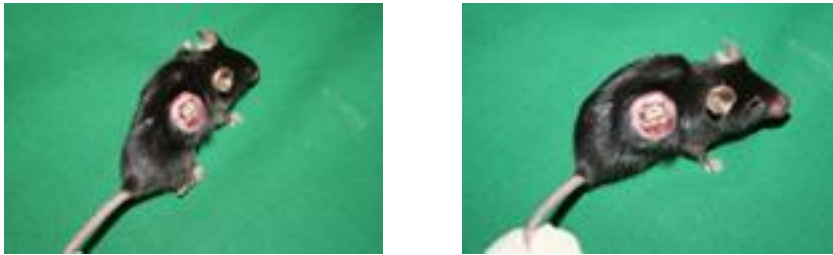


Abbildung 3.5: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papel, 21, Woche der TPA-Behandlung

Die Oberfläche war verkrustet und zeigte eine rote bis braune Verfärbung.

Nach 32 Wochen wurde die Behandlung mit TPA abgebrochen. Jeweils zwei Papeln mit einer Größe zwischen 0,3 cm und 0,5 cm konnten die noch nicht verstorbenen Mäuse aufweisen. Siehe hierzu auch Abbildung 3.6. In den weiteren sechs Wochen wiesen die Papeln ein geringeres Wachstum auf. Einige davon verkleinerten sich wieder nach der Beendigung der TPA-Behandlung und bildeten sich sogar zurück.

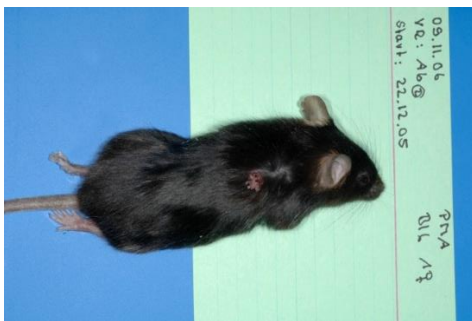


Abbildung 3.6: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papel, 14 Wochen nach letztmaliger TPA-Behandlung

Zusammenfassende Darstellung von VR A 2:

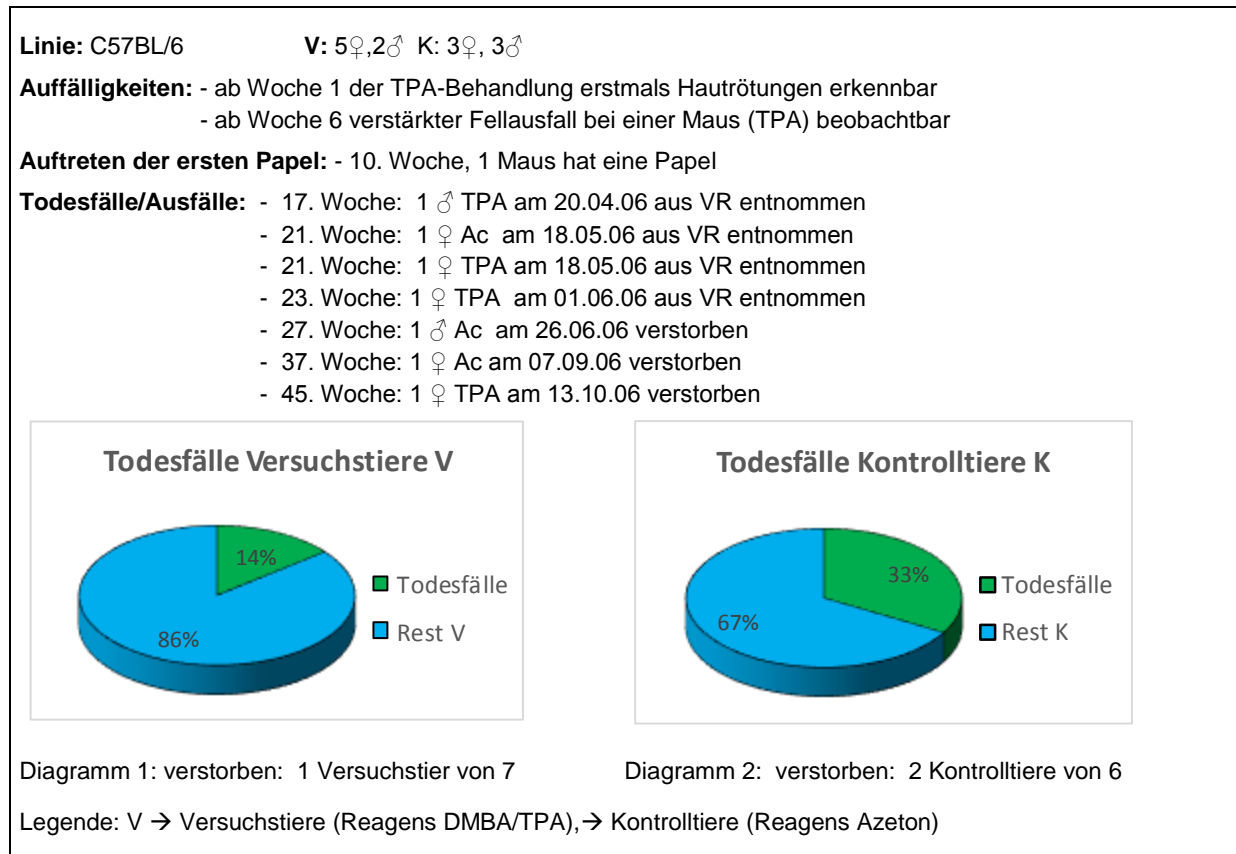


Abbildung 3.7: Zusammenfassung Versuchsreihe A 2, Mauslinie C57BL/6

3.1.1.3 Vergleich Versuchsreihe A 1 und A 2

Beim Vergleich beider Versuchsreihen, Abbildung 3.8, hat sich gezeigt, dass sich bei den Wildtypmäusen sechs Wochen früher Papeln entwickelten als bei den transgenen Mäusen der Linie *RelA^{k5Δ/k5Δ}*. Auffällig für uns war, dass bei den Wildtypmäusen die Haut nicht so stark entzündet und die Schuppenbildung der obersten Hautschicht nicht so ausgeprägt war, wie bei den *RelA^{k5Δ/k5Δ}* Mäusen. Bezogen auf die Papelanzahl pro Maus, konnten bei den transgenen Mäusen mehr Papeln gezählt werden. Hinsichtlich der Größe der Papeln gab es keine gravierenden Unterschiede. Insgesamt betrachtet entwickelte die Versuchsreihe der Wildtypmäuse weniger Papeln.

	VR A 1 <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i>	VR A 2 C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	16	10
Anzahl erster Papeln	2	1
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	2 / 28 %	1 / 14%
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0 -10	0-4
Ø in cm der Papel min.-max.	0,1-1,3	0,1-1,4

Abbildung 3.8: Ergebnisvergleich von VR A 1 und A 2

3.1.1.4 Versuchsreihe B 1

Ab der dritten TPA-Behandlungswoche konnten die ersten Hautveränderungen und 3 Wochen nach Versuchsbeginn der frühzeitige Tod einer mit TPA behandelten Maus, siehe Abbildung 3.9, festgestellt werden. In den darauffolgenden Wochen wurden Hautveränderungen verstärkt sichtbar, wie z.B. Entzündungsprozesse. Zwei Ansätze von Papeln mit der Größe von 0,1 cm konnte man in Woche 15 dokumentieren. Über einen längeren Zeitraum beobachteten wir Fellausfall bei den mit TPA behandelten Mäusen. Weitere Beobachtungen waren Entzündungen an den Augenpartien und Hautpigmentierungen. Einige Mäuse wiesen eine sehr wundte Haut auf und bei einzelnen Mäusen konnten sogar leichte Blutungen der Haut festgestellt werden. In Woche 35, mehrere Wochen nach Beendigung der TPA-Behandlung, wurde bei einer Maus ein Tumor beobachtet, der sich bis Woche 43 noch geringfügig vergrößerte.

Zusammenfassende Darstellung von VR B 1:

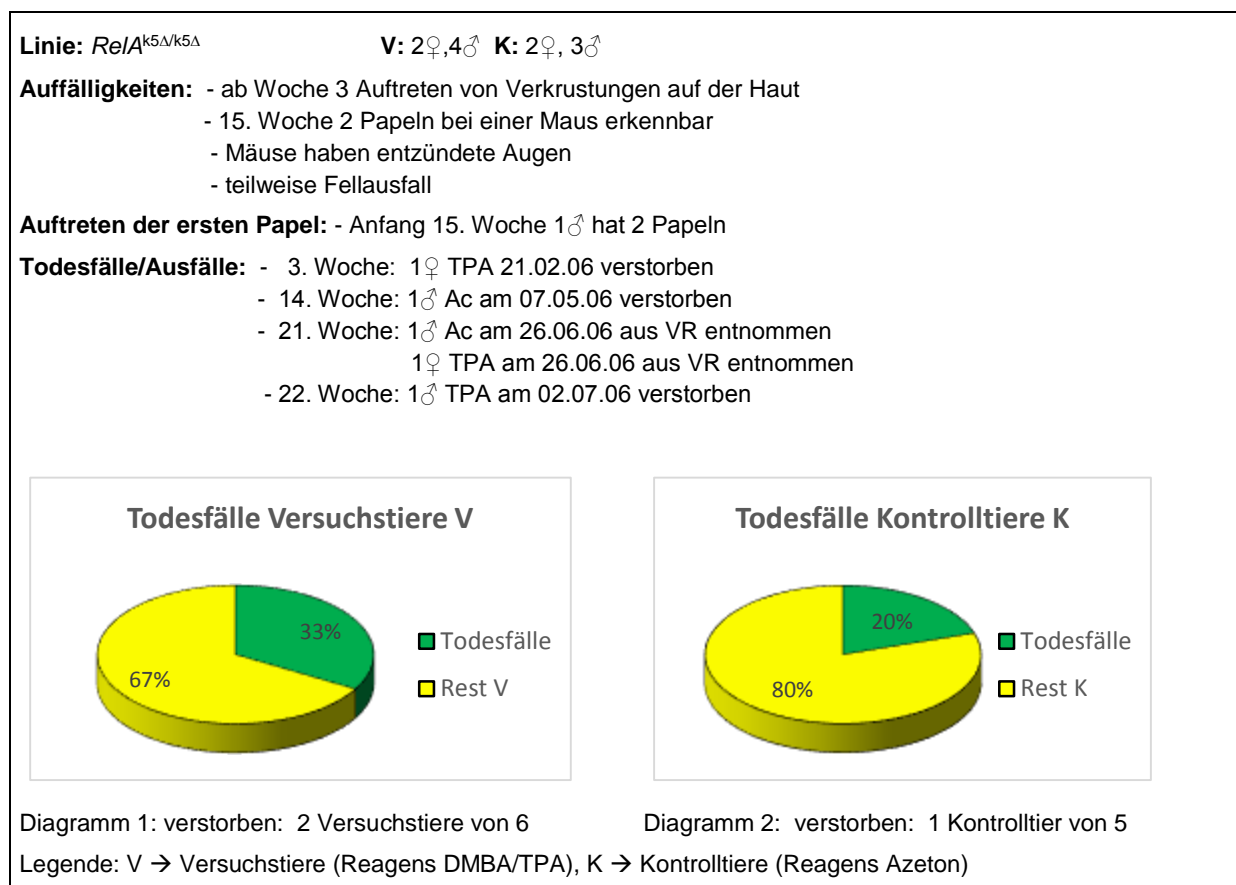


Abbildung 3.9: Zusammenfassung Versuchsreihe B 1, Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}*

3.1.1.5 Versuchsreihe B 2

In der 10. Behandlungswoche mit TPA waren erstmals Hautrötungen erkennbar. Drei Wochen später hatten sich 2 Papeln auf der Haut einer Maus gebildet. Ein wiederkehrendes Erscheinungsbild war die Schuppung der Haut. Über die Wochen verteilt, kamen weitere Papeln hinzu. Entzündungen und Verkrustungen der Hautoberfläche traten gehäuft auf. Weiterhin fiel auf, dass die Mäuse die Papeln abkratzten. Bis zum Ende der Behandlung mit TPA kam es zum leichten Anstieg der Tumoranzahl und der -größe. Nach Ende der Applikation des Tumorpromotors bildeten sich einige Papeln zurück (gutartige Tumore) und andere (bösartige Tumore), nahmen in den darauffolgenden Wochen an Größe zu, siehe Abbildung 3.10.

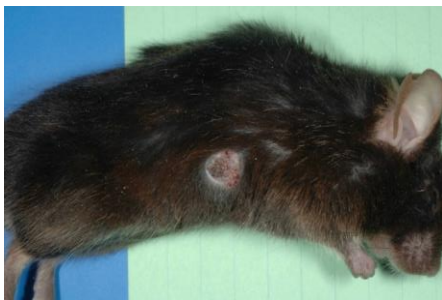


Abbildung 3.10: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Knoten, 20 Wochen nach letztmaliger TPA-Auftragung

Zusammenfassende Darstellung von B 2:

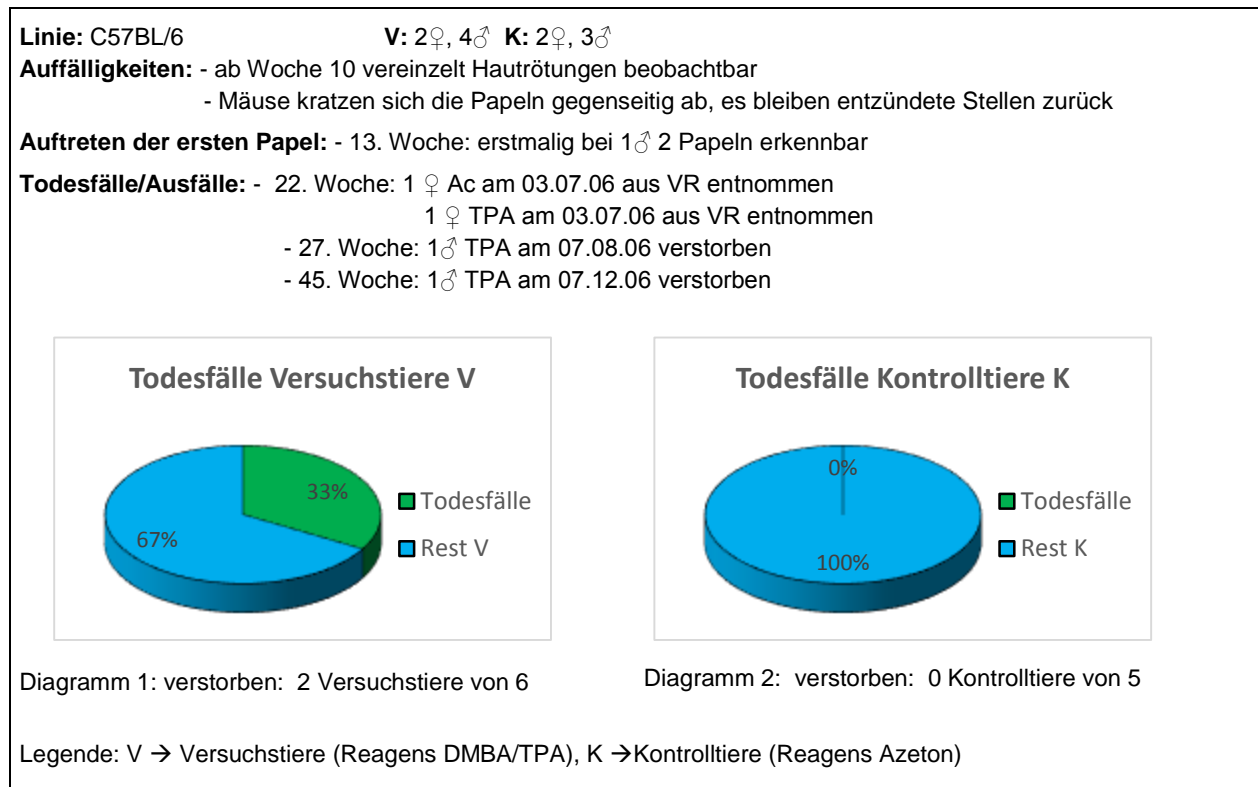


Abbildung 3.11: Zusammenfassung Versuchsreihe B 2 , Mauslinie C57BL/6

3.1.1.6 Vergleich Versuchsreihe B 1 und B 2

Bei der Versuchsreihe mit den Wildtypmäusen entwickeln sich zu einem früheren Zeitpunkt Papeln. Die Zeitdifferenz zu den transgenen Mäusen beträgt jedoch nur 2 Wochen. Die Papelanzahl pro Maus war bei den transgenen Mäusen geringer als bei den Wildtypmäusen. Auch die Gesamtanzahl an Papeln pro Versuchsreihe war bei den Wildtypmäusen höher. Beides sind gegensätzliche Ergebnisse zu VR A. Bezogen auf die Größe der Papeln hatten die Wildtypmäuse den größten Durchmesser zu verzeichnen.

	VR B 1 <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	VR B 2 C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	15	13
Anzahl erster Papeln	2	2
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	1 / 16 %	1 / 16 %
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0-1	0-4
Ø in cm der Papel min.-max.	0,1-0,3	0,1-0,7

Abbildung 3.12: Ergebnisvergleich von VR B 1 und B 2

3.1.1.7 Versuchsreihe C 1

Nach einer Woche Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA traten auch hier erste Entzündungsherde der Haut auf. Außerdem war eine anfängliche Schuppenbildung an der Hautoberfläche erkennbar. In den darauffolgenden Wochen konnte Fellausfall bei den mit TPA behandelten Mäusen beobachtet werden. Die Hautentzündungen nahmen zu und die Oberfläche der Haut war wieder stark verkrustet. Noch hervorzuheben wäre, dass sich in dieser Versuchsreihe im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen relativ spät die erste Papel entwickelte. Man musste jedoch berücksichtigen, dass vier von fünf Versuchstieren frühzeitig verstorben sind. In der 26. Woche konnte bei dem noch verbliebenen Versuchstier eine Papel mit einer Größe von 0,2 cm festgestellt werden. Die Hautoberfläche war schuppig, stark verkrustet und die Maus war in einem körperlich schwachen Zustand. Bei den mit Azeton behandelten Mäusen waren bis auf einen geringfügigen Fellverlust, keine Veränderungen festzustellen, siehe Abbildung 3.13. Noch vor dem planmäßigen Beenden der TPA-Behandlung schied das letzte Versuchstier durch ungeklärte Todesursache aus dieser Reihe aus. Folglich musste diese Versuchsreihe ab diesem Zeitpunkt abgebrochen werden.

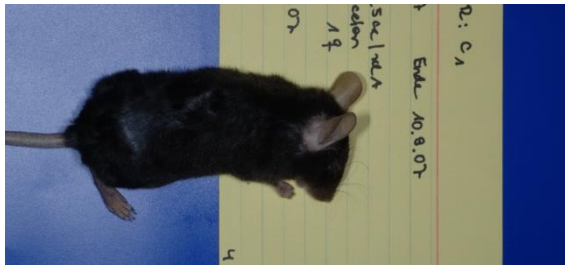


Abbildung 3.13: transgene Maus (Linie: $RelA^{k5\Delta/k5\Delta}$), mit Azeton behandelte Maus, nach 3 wöchiger Behandlung

Zusammenfassende Darstellung von VR C 1:

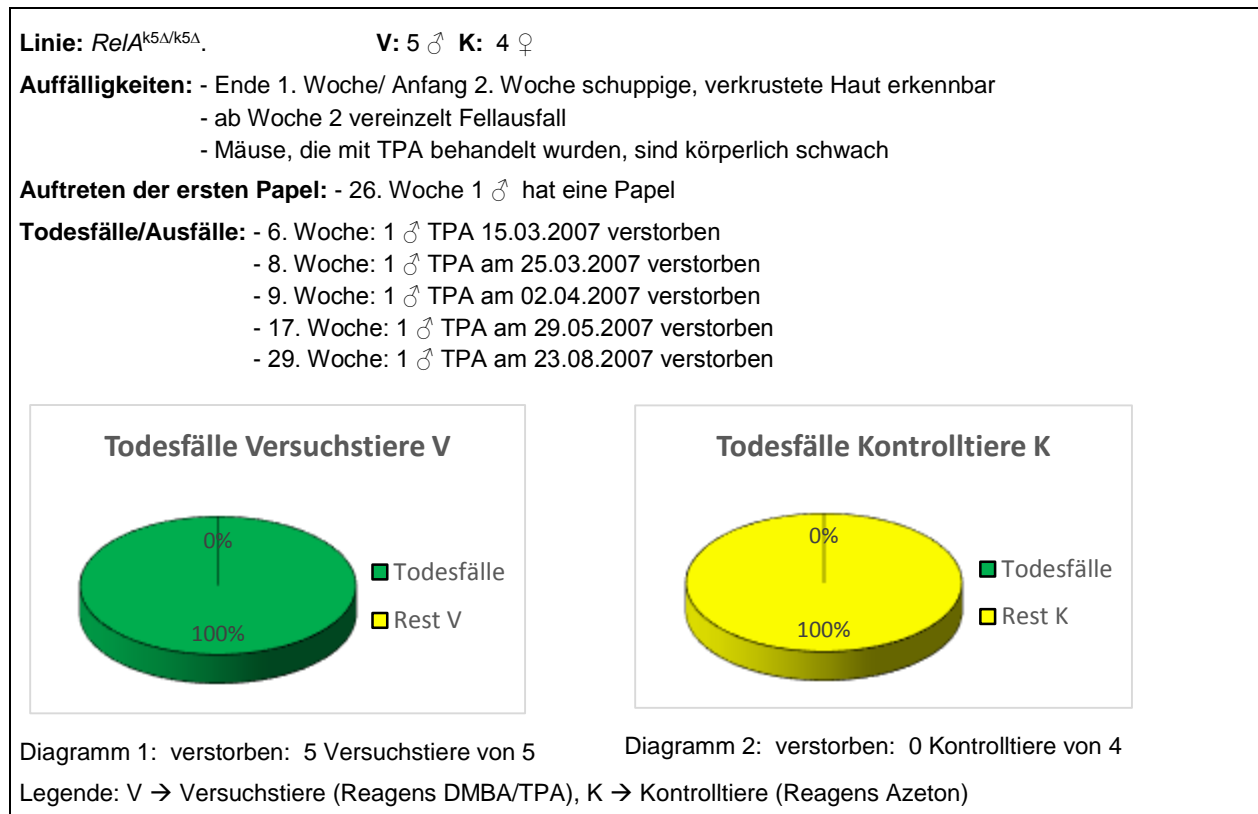


Abbildung 3.14: Zusammenfassung Versuchsreihe C 1 , Mauslinie $RelA^{k5\Delta/k5\Delta}$

3.1.1.8 Versuchsreihe C 2

In den ersten Wochen der TPA-Behandlung wurden Hautveränderungen, wie kleine Entzündungsherde und Hautschuppung, beobachtet. Ab Woche 14 entwickelte sich die erste Papel und die zweite Papel entstand zwei Wochen später bei einer anderen Maus. Über einen längeren Zeitraum beobachteten wir auch bei dieser Versuchsreihe eine Zunahme der Anzahl und Größe der Papeln. In der 25. Behandlungswoche mit TPA konnten bei einer Maus fünf Papeln mit einem

Durchmesser von 0,1-0,3 cm gezählt werden. Fellausfall und eine krustige Haut waren ebenfalls zu verzeichnen.

Nach Ende der TPA-Behandlung konnten wir bei vier von fünf Mäusen Papeln feststellen. Außerdem beobachteten wir, dass einige Papeln von den Mäusen abgekratzt wurden, aber diese sich nach einer bestimmten Zeit wieder neu herausbildeten. Die darauffolgenden Wochen ohne Tumorpromotorgabe zeigten, dass sich einzelne Papeln vergrößerten und zum anderen die Papeln in ihrer Größe schrumpften oder komplett verschwanden.

Zusammenfassende Darstellung von C 2:

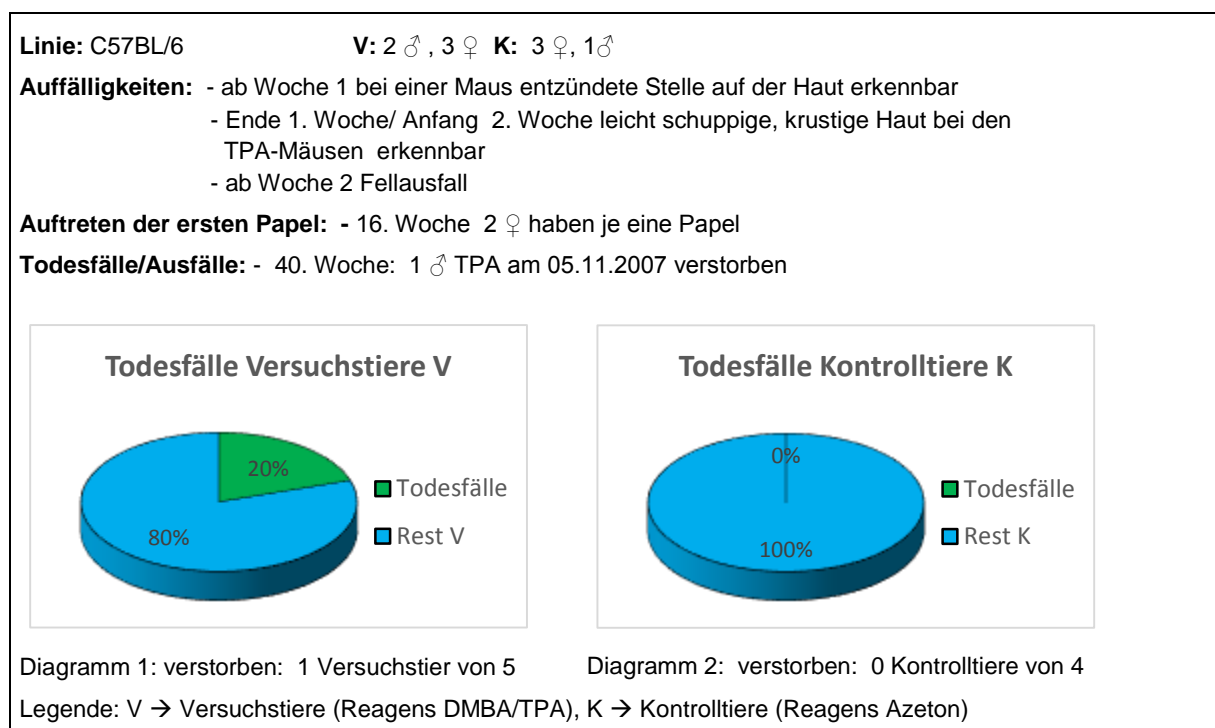


Abbildung 3.15: Zusammenfassung Versuchsreihe C 2 , Mauslinie C57BL/6

3.1.1.9 Vergleich Versuchsreihe C 1 und C 2

	VR C 1 <i>ReIA^{k5Δ/k5Δ}</i>	VR C 2 C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	26	14
Anzahl erster Papeln	1	2
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	1/ 20 %	1 / 20 %
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0-1	0-8
Ø in cm der Papel min.-max.	-0,3	0,1-1

Abbildung 3.16: Ergebnisvergleich von VR C 1 und C 2

Beim Vergleich beider Versuchsreihen konnte erneut bestätigt werden, dass die Entwicklung von Papeln bei den Wildtypmäusen zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt. Man muss jedoch berücksichtigen, dass Versuchsreihe C 1 aufgrund des

frühzeitigen Ausscheidens von 4 von 5 Versuchstieren nicht für eine genaue Auswertung herangezogen werden kann und die Beobachtungen sich auf ein Versuchstier beschränkten. Trotz dieser Bedingungen war bei den Wildtypmäusen die Papelanzahl pro Maus höher und größere Papeldurchmesser konnten gemessen werden. Fellausfall und Hautverkrustungen waren bei Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* stärker ausgeprägt. Bezogen auf die Gesamtanzahl an Papeln pro Versuchsreihe kann die Vermutung aufgestellt werden, dass auch die Wildtypmäuse mehr Papeln entwickelten.

3.1.1.10 Zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse bezogen auf die Applikation mit TPA zweimal pro Woche

Betrachtet man die Versuchsreihen A-C nun im Zusammenhang, so haben die Beobachtungen gezeigt, dass die Tumorentstehung bei Wildtypmäusen zu einem früheren Zeitpunkt zu verzeichnen ist, siehe Diagramm Abbildung 3.17. Unter Ausgrenzung von Versuchsreihe C aufgrund der vorliegenden Versuchsbedingungen betrug der Zeitabstand 4 Wochen im Mittel, bis es zur Tumorentstehung bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen kam. Die Wildtypmäuse zeigten die ersten Anzeichen für eine Tumorentstehung zwischen der 10. und der 13. Woche, die transgenen Mäuse dagegen erst zwischen der 15. und 16. Woche der TPA-Behandlung. Typische Hautveränderungen, wie Schuppenbildung, Fellausfall und Hautverkrustungen konnten, bezogen auf die jeweilige Mauslinie, wiederholt bestätigt werden. Verstärkte Entzündungsprozesse und Schuppenbildung wurden zunehmend bei den transgenen Mäusen beobachtet. Beziehen wir uns auf die Papelanzahl pro Maus und pro Versuchsreihe, so lag die Tendenz bei den Wildtypmäusen, mehr Papeln zu entwickeln. Außerdem tendierten die Wildtypmäuse zur Bildung größerer Papeldurchmesser. Zum Zeitpunkt der Beobachtung erster Tumoransätze war hauptsächlich ein Versuchstier bei beiden Mauslinien gleichermaßen betroffen. Angesichts der kleinen Versuchsgruppen von 5-7 Versuchstieren entspricht dies ca. 21%. Letztendlich entwickelten über 50% der Versuchstiere pro Versuchsreihe (ausgenommen Versuchsreihe C 1) bezogen auf beide Mauslinien Papeln bzw. Tumore, die mit TPA behandelt wurden. Auch hier geht die Tendenz zu einer höheren Inzidenzrate bei den Wildtypmäusen hin.

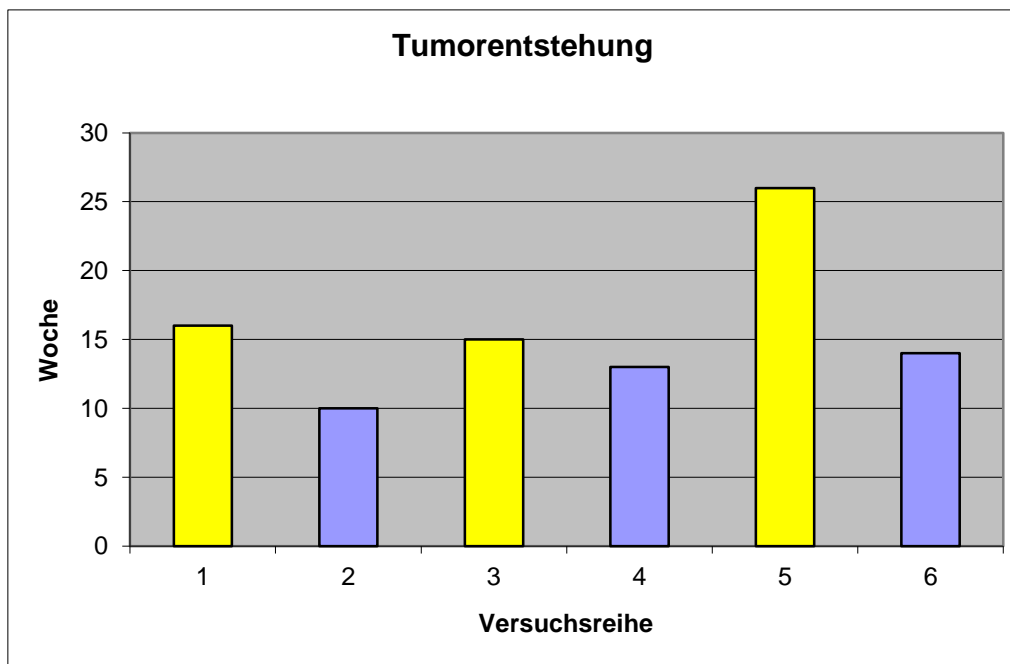


Abbildung 3.17: erstmalige Tumorentstehung bei der zweimaligen Auftragung des Tumorpromotors TPA pro Woche, Vergleich von Linie *ReIA^{k5Δ/k5Δ}* und Linie C57BL/6

- 1 Versuchsreihe A 1
Linie: *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*
- 2 Versuchsreihe A 2
Linie: C57BL/6
- 3 Versuchsreihe B 1
Linie: *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*
- 4 Versuchsreihe B 2
Linie: C57BL/6
- 5 Versuchsreihe C 1
Linie: *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*
- 6 Versuchsreihe C 2
Linie: C57BL/6

Die nachfolgenden Abbildungen, Abbildung 3.18 bis Abbildung 3.21, zeigen eine zusammenfassende Übersicht über auftretende Todesfälle während der Versuche. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen konnten bei den transgenen Mäusen geringfügig mehr Todesfälle verzeichnet werden, die mit TPA behandelt wurden. Betrachtet man die Mäuse, die nur mit Azeton behandelt wurden, so verstarben prozentual mehr von der transgenen Mauslinie.

	VR A1	VR B1	VR C1
Anzahl Todesfälle / %	1 / 14%	2 / 33 %	5 / 100%
geschlechtsbezogen	1 ♀	1 ♀ 1 ♂	5 ♂
Zeitraum	23. Woche	3-22. Woche	6-29. Woche

Abbildung 3.18: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie *ReIA^{k5Δ/k5Δ}* bei zweimaliger Applikation mit TPA pro Woche

	VR A1	VR B1	VR C1
Anzahl Todesfälle / %	3 / 50 %	1 / 20 %	. / 0%
geschlechtsbezogen	1 ♀ 2 ♂	1 ♂	. /
Zeitraum	14.-20. Woche	14. Woche	. /

Abbildung 3.19: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* bei zweimaliger Applikation mit Azeton pro Woche

	VR A2	VR B2	VR C2
Anzahl Todesfälle / %	1 / 14%	2 / 33%	1 / 20 %
geschlechtsbezogen	1 ♀	2 ♂	1 ♂
Zeitraum	45. Woche	27.-45 Woche	40. Woche

Abbildung 3.20: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei zweimaliger Applikation mit TPA pro Woche.

	VR A2	VR B2	VR C2
Anzahl Todesfälle/ %	2 / 33 %	. / 0%	. / 0%
geschlechtsbezogen	1 ♀ 1 ♂	. /	. /
Zeitraum	27.-37. Woche	. /	. /

Abbildung 3.21: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei zweimaliger Applikation pro Woche mit Azeton

3.2 Beobachtungen und Auswertung der Versuchsreihen X 1 - 4

Bei der Durchführung dieser Versuche galt es herauszufinden, welchen Einfluss die dreifache Applikation von TPA pro Woche mit zusätzlich erhöhter Konzentration von TPA bei der Entstehung von Hauttumoren spielt im Vergleich zu Wildtypmäusen und transgenen Mäusen, bei denen das Gen, welches RelA (p65) codiert, in der Epidermis der Haut deletiert wurde. Um die erhaltenen Ergebnisse der ersten zwei Versuchsreihen bestätigen zu können, wurden zwei weitere Versuchsreihen mit ähnlichen Aufbau und wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Der Aufbau der Versuchsreihen ist in Abbildung 3.22 zu sehen. Aufgrund des ähnlichen Verlaufs von Versuchsreihe X 1 ^{1/2} und X 3 ^{1/2} und ebenso von X 2 ^{1/2} und X 4 ^{1/2}, wurden jeweils diese zwei Versuchsreihen zusammen ausgewertet.

3.2.1.1 Versuchsreihen X 1 ₁ und X 3 ₁

Zu Beginn der TPA-Behandlung reagierte die Haut sehr empfindlich. Auf der Hautoberfläche setzte wieder Schuppenbildung ein. Entzündete und wund Hautpartien konnten ebenfalls protokolliert werden. Im Bereich der Applikationsstelle stellten wir auch wieder verstärkten Fellausfall fest, siehe Abbildung 3.23. Die ersten Papeln entwickelten sich in der 11. (VR: X 1 ₁) und in der 12. (VR X 3 ₁)

Behandlungswoche mit TPA. Beim Ausbleiben der TPA-Applikation bildeten sich die Papeln zurück und verschwanden teilweise komplett.

Versuchsreihe X 1₁ Linie: <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> Start: 14.05.2007 Versuchstiere: 4 ♂ Kontrolltiere: 3 ♀ Ende der Versuchsreihe: 21.12.2007 (31. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 20. Woche	Versuchsreihe X 1₂ Linie: C57BL/6 Start: 14.05.2007 Versuchstiere: 4 ♀ Kontrolltiere: 2 ♂ Ende der Versuchsreihe: 21.12.2007 (31. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 20. Woche
Versuchsreihe X 2₁ Linie: <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> Start: 09.07.2007 Versuchstiere: 4 ♂, 2 ♀ Kontrolltiere: 3 ♂ Ende der Versuchsreihe: 03.01.2008 (25. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 20. Woche	Versuchsreihe X 2₂ Linie: C57BL/6 Start: 09.07.2007 Versuchstiere: 5 ♂ Kontrolltiere: 5 ♀ Ende der Versuchsreihe: 03.01.2008 (25. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 20. Woche
Versuchsreihe X 3₁ Linie: <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> Start: 10.09.2007 Versuchstiere: 1 ♂, 6 ♀ Kontrolltiere: 2 ♂ Ende der Versuchsreihe: 07.01.2008 (17. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 14. Woche	Versuchsreihe X 3₂ Linie: C57BL/6 Start: 10.09.2007 Versuchstiere: 3 ♂, 3 ♀ Kontrolltiere: 3 ♂ Ende der Versuchsreihe: 07.01.2008 (17. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 14. Woche
Versuchsreihe X 4₁ Linie: <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> Start: 25.02.2008 Versuchstiere: 5 ♀ Kontrolltiere: 4 ♂ Ende der Versuchsreihe: 08.08.2008 (23. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 17. Woche	Versuchsreihe X 4₂ Linie: C57BL/6 Start: 25.02.2008 Versuchstiere: 5 ♂ Kontrolltiere: 4 ♀ Ende der Versuchsreihe: 08.08.2008 (23. Woche) Letzte Behandlung mit TPA: 17. Woche

Abbildung 3.22 Aufbau der Versuchsreihen X1-4, Applikation mit TPA erfolgte 3x pro Woche



Abbildung 3.23: transgene Maus (Linie: *RelA^{k5Δ/k5Δ}*), Papeln, 20 Wochen nach Start der TPA-Behandlung

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 1₁ :

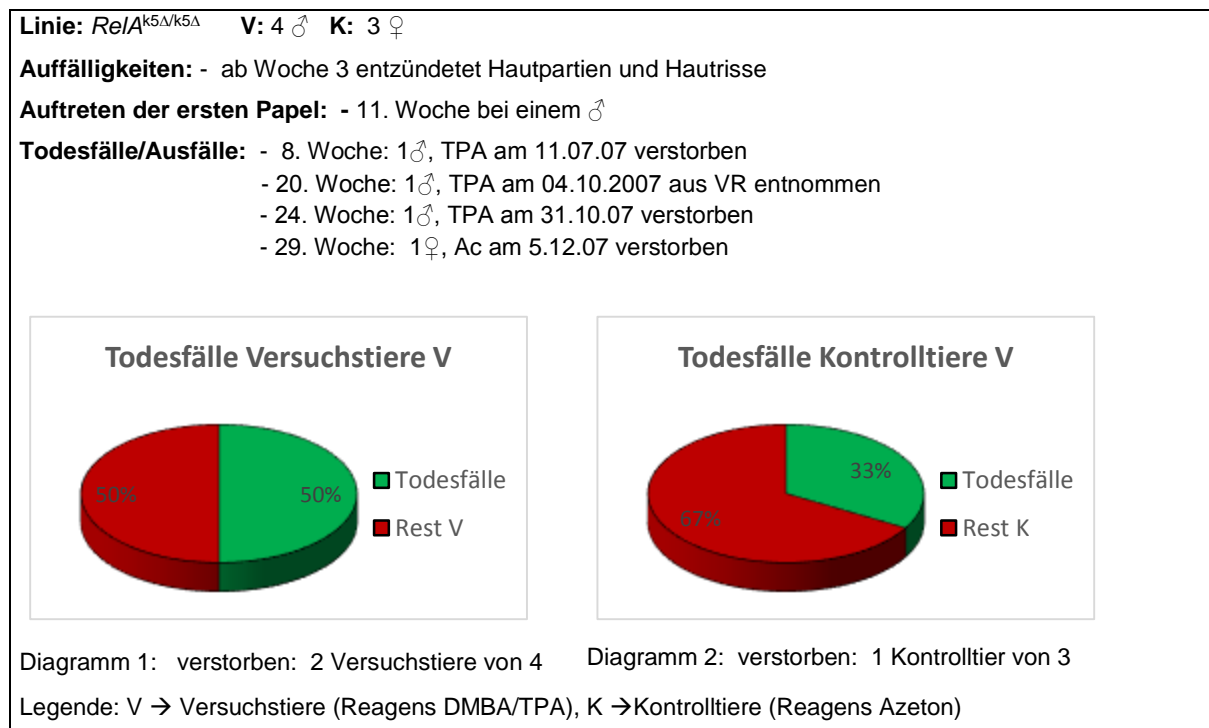


Abbildung 3.24: Zusammenfassung Versuchsreihe X 1₁, Mauslinie $Re/A^{k5\Delta/k5\Delta}$

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 3₁ :

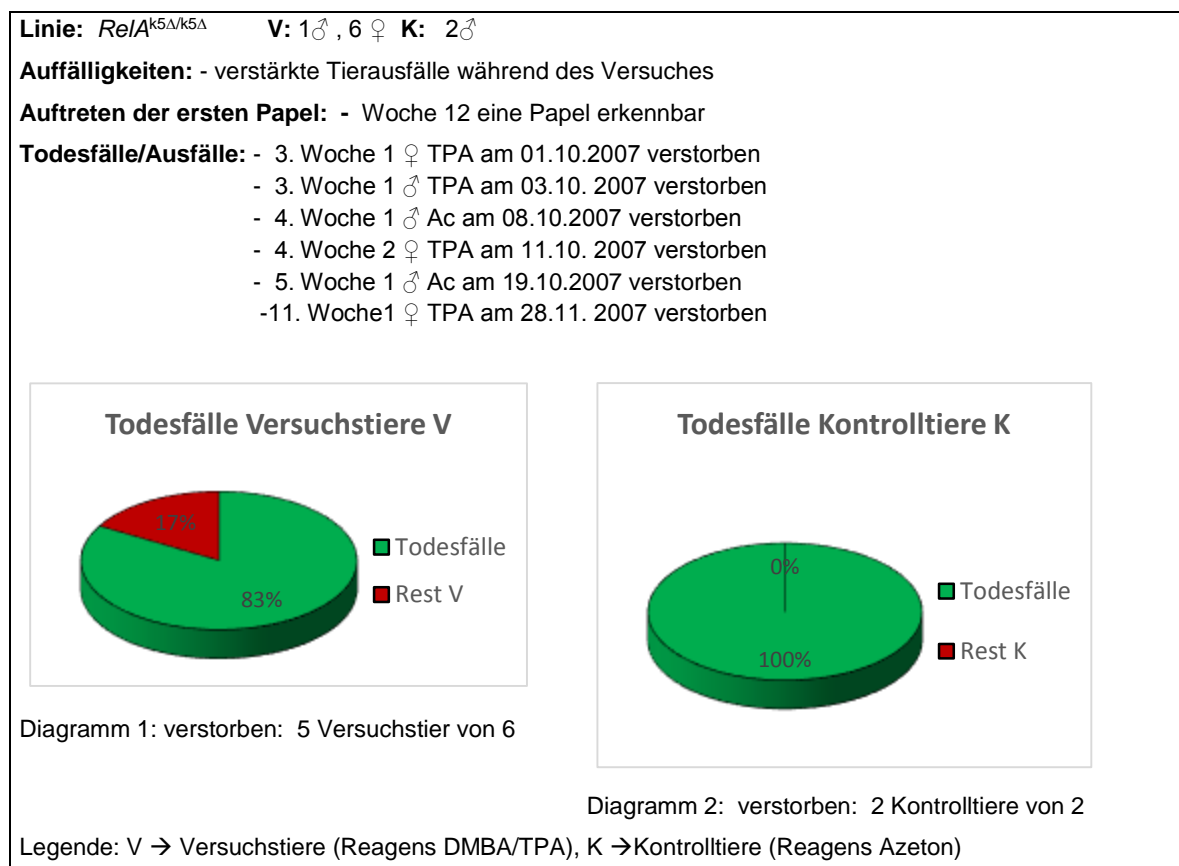


Abbildung 3.25: Zusammenfassung Versuchsreihe X 3₁, Mauslinie $Re/A^{k5\Delta/k5\Delta}$

Bei anderen Papeln konnte jedoch auch ein weiteres Wachstum beobachtet werden. Diese verkleinerten sich aber nach einem bestimmten Zeitraum wieder. Bei den Kontrollmäusen waren keine besonderen Auffälligkeiten zu verzeichnen.

3.2.1.2 Versuchsreihen X 1₂ und X 3₂

Zum Vergleich der beiden Mauslinien wurden die Wildtypmäuse ebenfalls dreimal die Woche mit TPA behandelt. Es traten die bekannten Hautveränderungen (z.B. Schuppenbildung, wunde und entzündete Haut, siehe Abbildung 3.26) auf, die bereits bei den vorhergehenden Versuchen bei zweimaliger TPA-Applikation beobachtet wurden. Erste Papeln entstanden in der 9. (VR X 1₂) bzw. 7. Woche (VR X 3₂). Nach Abbruch der Tumorpromotorgabe kam es zur weiteren Zunahme der Papelanzahl, die aber nach kurzer Zeit wieder abnahm. Bei den Kontrolltieren wurde vereinzelt Fellausfall beobachtet.



Abbildung 3.26: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), TPA-behandelt, wunde, entzündete Haut, 16. Woche der TPA-Behandlung

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 1₂ :

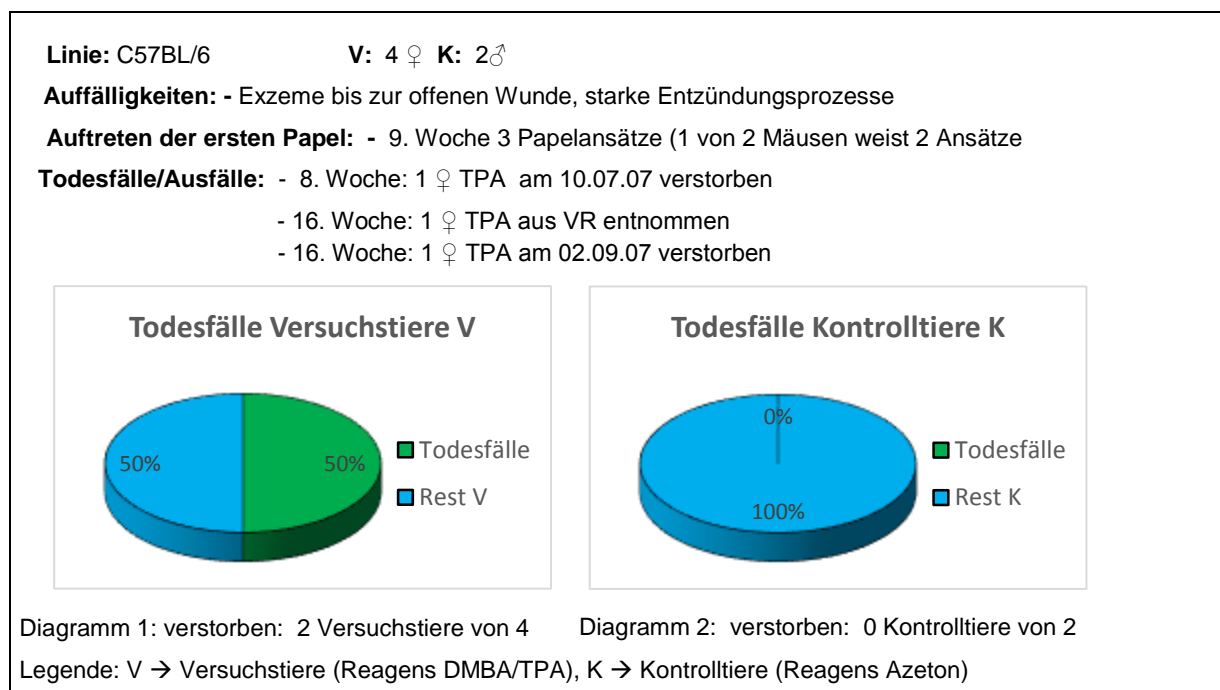


Abbildung 3.27: Zusammenfassung Versuchsreihe X 1₂, Mauslinie C57BL/6

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 3 2 :

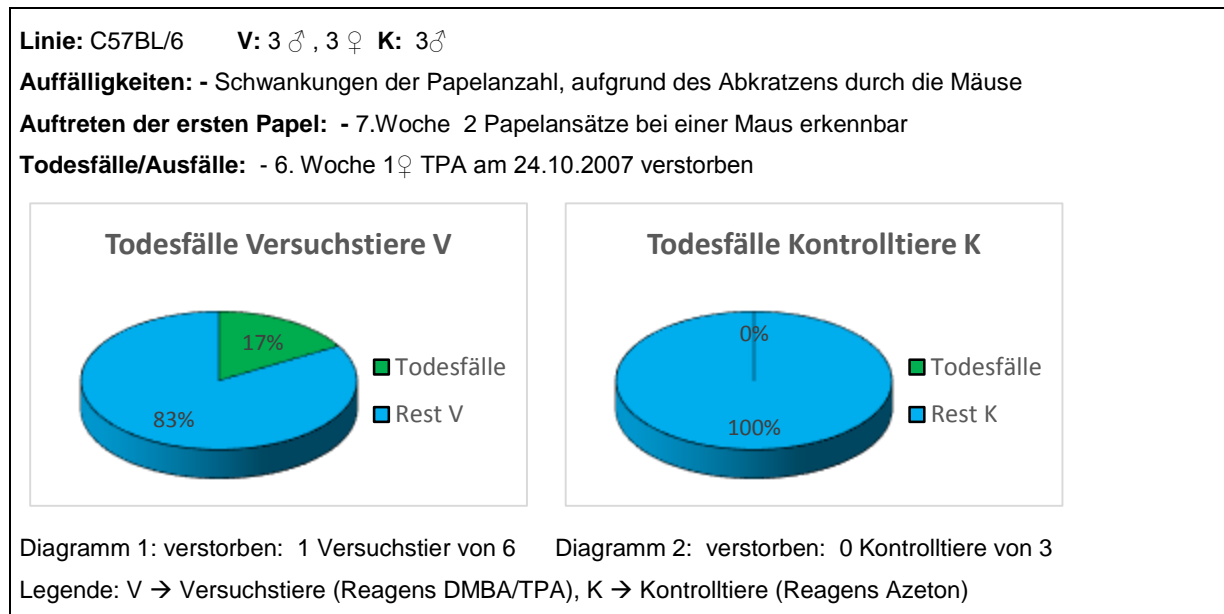


Abbildung 3.28: Zusammenfassung Versuchsreihe X 3 2, Mauslinie C57BL/6

3.2.1.3 Vergleich Versuchsreihen X 1 1 / X 3 1 und X 1 2 / X 3 2

Zeitgleich waren bei beiden Mauslinien starke Hautveränderungen, wie oben erwähnt, zu beobachten. Die Wildtypmäuse entwickelten zu einem früheren Zeitpunkt die ersten Papeln. Bezogen auf die Papelanzahl pro Maus, konnten bei beiden Versuchsreihen bei den Wildtypmäusen mehr Papeln gezählt werden. Keine Unterschiede gab es bei der Papelgröße. Bei Versuchsreihe X 3 war es die Gruppe der Wildtypmäuse, die insgesamt mehr Papeln entwickelte, bei Versuchsreihe X 1 dagegen geringfügig die Gruppe der transgenen Mäuse einige Wochen nach Beenden der TPA-Behandlung.

	VR X 1 1 <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	VR X 1 2 C57BL/6	VR X 3 1 <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	VR X 3 2 C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	11	9	12	7
Anzahl erster Papeln	1	3	1	2
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	1 / 25%	2 / 50 %	1 / 14%	1 / 16 %
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0-5	0-7	0-6	0-10
in cm der Papel min.-max.	0,1-0,6	0,1-0,6	0,1-0,3	0,1-0,3

Abbildung 3.29: Ergebnisvergleich von VR X 1 1 und X 1 2 und VR X 3 1 und X 3 2

3.2.1.4 Versuchsreihen X 2 1 und X 4 1

Kurze Zeit nach Start der TPA-Behandlung konnten bei den transgenen Mäusen verstärkter Fellausfall und eine entzündete Hautoberfläche, siehe Abbildung 3.30

und Abbildung 3.31, beobachtet werden. Einige Mäuse verloren an Körpergewicht und infolgedessen ließ auch die körperliche Aktivität nach. Die ersten Ansätze von Papeln wurden in Woche 6 (VR X 2 ₁) und in Woche 10 (VR X 4 ₁) notiert. Während der Promotorapplikation kam es zu einem Anstieg der Anzahl an Papeln. Diese variierte teils, da die Mäuse versuchten die Hautanomalien durch Abkratzen zu entfernen. Als dann die TPA-Gabe beendet wurde, sank die Anzahl an Papeln wieder. Betrachten wir noch die mit Azeton behandelten Mäuse, so waren bis auf Hautreizungen und geringfügiger Fellausfall an der Applikationsstelle keine besonderen Auffälligkeiten zu verzeichnen.



Abbildung 3.30: Transgene Maus
(Linie: $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), verkrustete Hautoberfläche,
3 Wochen nach Ende der TPA-Behandlung

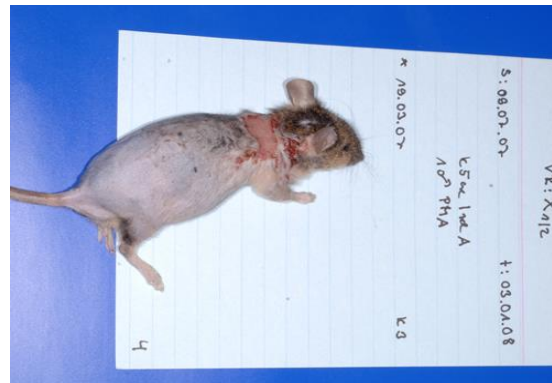


Abbildung 3.31: Transgene Maus
(Linie: $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), starke Entzündung der
Haut, 5 Wochen nach der letzten TPA-
Behandlung

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 2 ₁ :

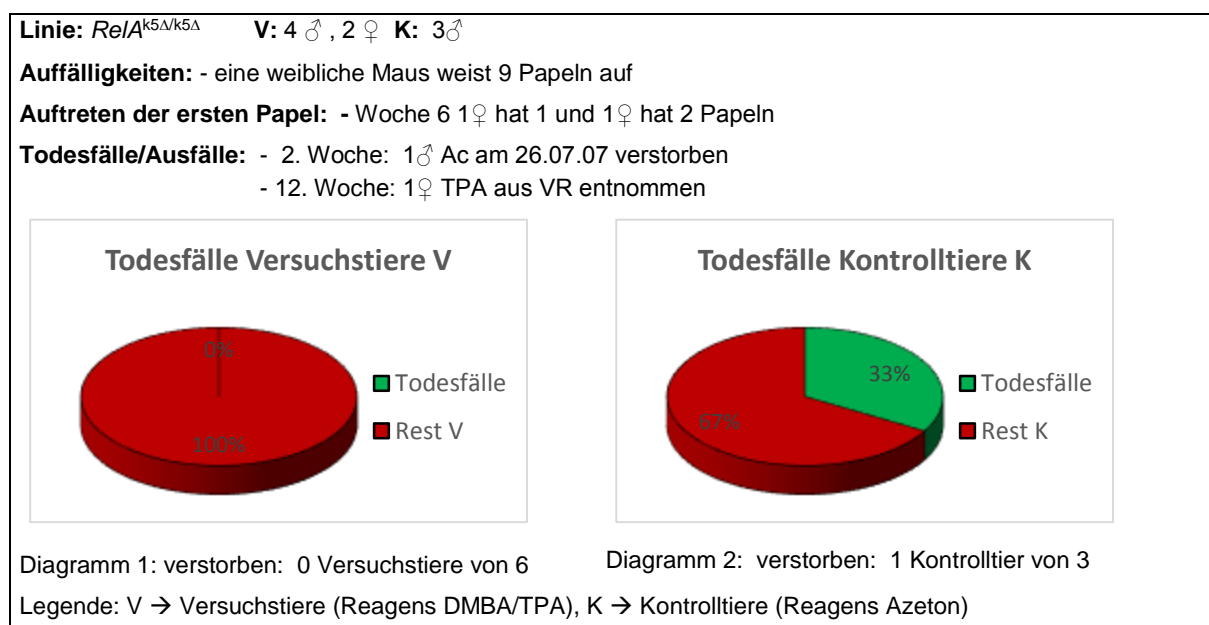


Abbildung 3.32: Zusammenfassung Versuchsreihe X 2 ₁, Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 4 1:

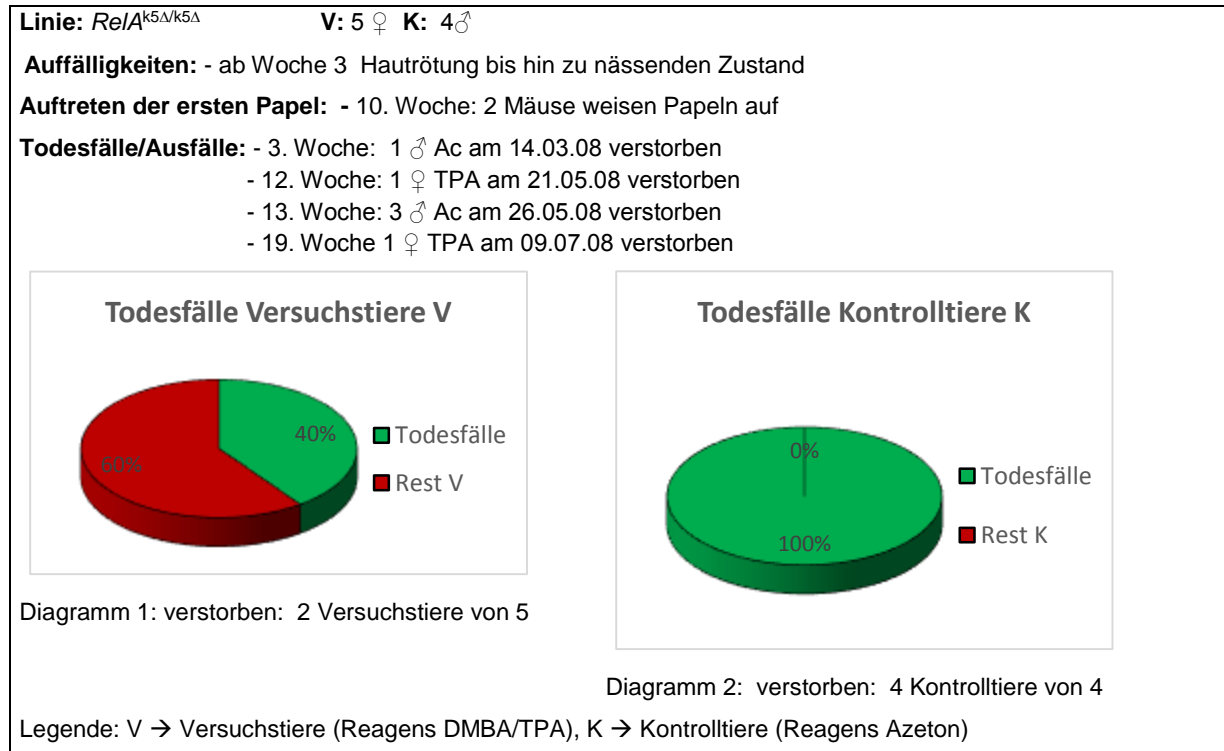


Abbildung 3.33: Zusammenfassung Versuchsreihe X 4 1, Mauslinie *RelA*^{k5Δ/k5Δ}

3.2.1.5 Versuchsreihen X 2 2 und X 4 2

Die Wildtypmäuse verhielten sich ähnlich. Auch hier traten wieder zu Beginn der TPA-Behandlung Schuppenbildung und Hautrötung auf. Die ersten Papeln entwickelten sich in Woche 6 (VR X 2 2) und in Woche 10 (VR X 4 2), Abbildung 3.39. Am Ende der TPA-Applikation kam es u.a. zu einer Rückbildung entstandener Papeln, Abbildung 3.34.



Abbildung 3.34: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papeln, 5 Wochen nach der letzten TPA-Behandlung

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 2 2 :

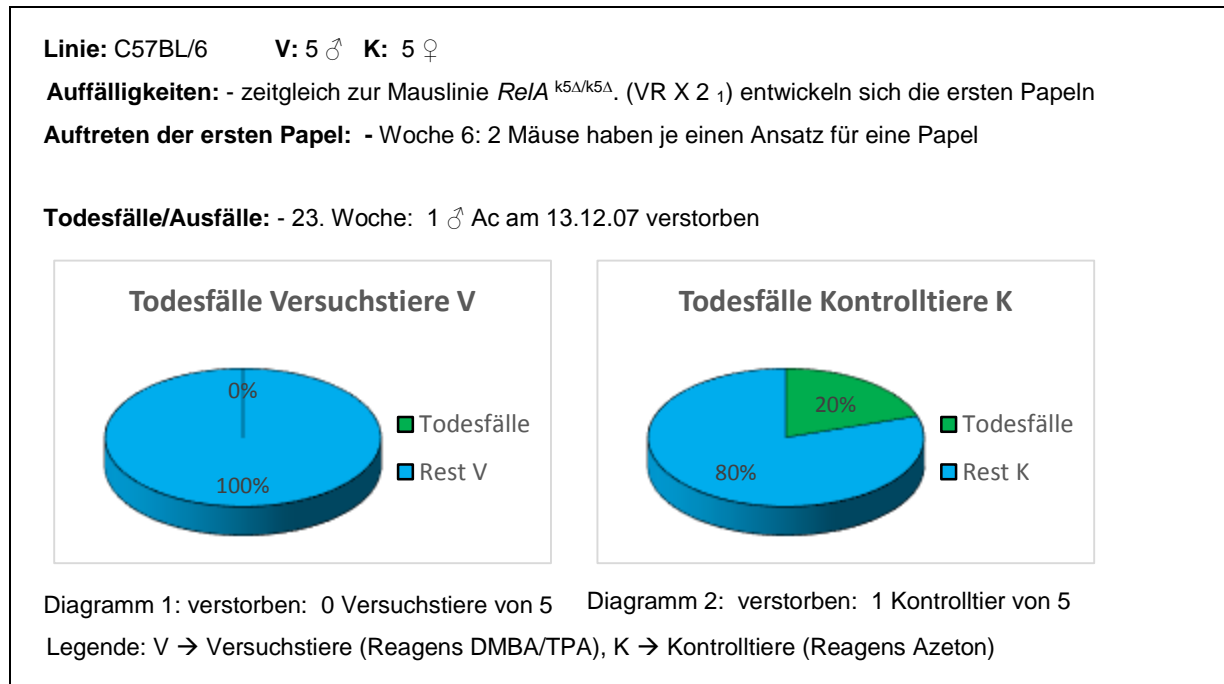


Abbildung 3.35: Zusammenfassung Versuchsreihe X 2 2, Mauslinie C57BL/6

Zusammenfassende Darstellung Versuchsreihe X 4 2:

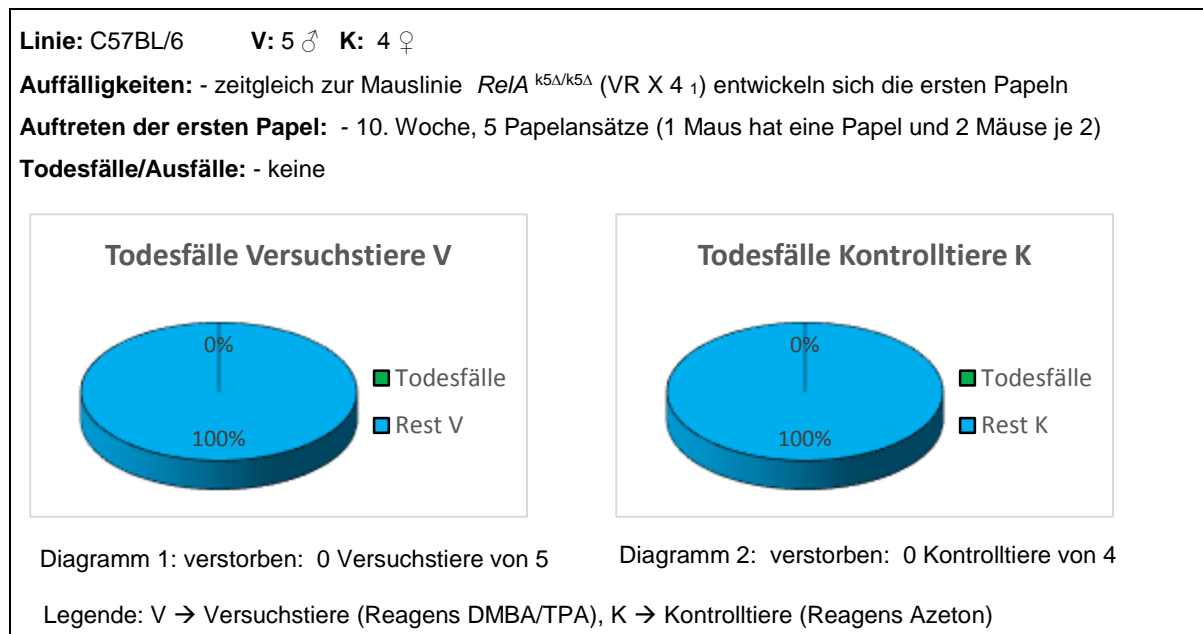


Abbildung 3.36: Zusammenfassung Versuchsreihe X 4 2, Mauslinie C57BL/6

3.2.1.6 Vergleich Versuchsreihen X 2₁ / X 4₁ und X 2₂ / X 4₂

	VR X 2 ₁ <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	VR X 2 ₂ C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	6	6
Anzahl erster Papeln	3	2
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	2 / 33%	2 / 40%
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0-14	0-14
in cm der Papeln min.-max.	0,1-0,9	0,1-0,7

Abbildung 3.37 Ergebnisvergleich von VR X 2₁ und X 2₂

	VR X 4 ₁ <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	VR X 4 ₂ C57BL/6
Beobachtung erster Papeln in Woche	10	10
Anzahl erster Papeln	3	5
Anzahl der Mäuse / in % mit ersten Papeln	2 / 40%	3 / 60%
Anzahl der Papeln nach Ende der VR pro Maus	0-5	0-6
in cm der Papeln min.-max.	0,1-0,4	0,1-0,4

Abbildung 3.38 Ergebnisvergleich von VR X 4₁ und X 4₂

Schon zu Beginn der TPA – Behandlung beobachteten wir Hautveränderungen bei beiden Mauslinien. Die Hautentzündungen waren bei den transgenen Mäusen stärker ausgeprägt. Wildtypmäuse und transgene Mäuse entwickelten bei beiden Versuchsreihen in der gleichen TPA-Behandlungswoche erstmalig Papeln. Wir konnten auch bezüglich der Papelanzahl pro Maus und der Papelgröße zwischen Wildtypmäusen und transgenen Mäusen keine gravierenden Unterschiede feststellen. Auch bei diesen beiden Versuchsreihen entwickelten sich bei den Wildtypmäusen verhältnismäßig mehr Papeln.

3.2.1.1 Zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse bezogen auf die Applikation mit TPA dreimal pro Woche und erhöhter Konzentration von TPA

Anhand der vier durchgeführten Versuchsreihen wurde gezeigt, dass die Tumorentstehung bei Wildtypmäusen zu einem früheren Zeitpunkt oder zeitgleich im Vergleich zu den transgenen Mäusen einsetzen kann, siehe Diagramm Abbildung 3.39. Im Durchschnitt war die Erstentwicklung von Papeln bei den transgenen Mäusen 3,5 Wochen später zu beobachten. Beide Mauslinien reagierten sehr empfindlich auf die dreimalige Applikation von TPA auf die Haut. Hautentzündungen und Schuppenbildung wurden bei den transgenen Mäusen verstärkt beobachtet. Betrachtet man die Papelanzahl pro Maus und pro Versuchsreihe, so lag auch hier die Tendenz bei den Wildtypmäusen, mehr Papeln zu entwickeln. Bei der

Papelgröße zeigten beide Mauslinien keine Unterschiede. Zum Zeitpunkt der Beobachtung erster Tumorsätze waren im Schnitt 1-2 Versuchstiere bei beiden Mauslinien betroffen. Angesichts der kleinen Versuchsgruppen von 5-7 Versuchstieren entspricht dies 17%. Letztendlich entwickelten über 50% der Versuchstiere pro Versuchsreihe (ausgenommen Versuchsreihe C 1) bezogen auf beide Mauslinien Papeln bzw. Tumore, die mit TPA behandelt wurden. Auch hier geht die Tendenz zu einer höheren Inzidenzrate zu den Wildtypmäusen hin.

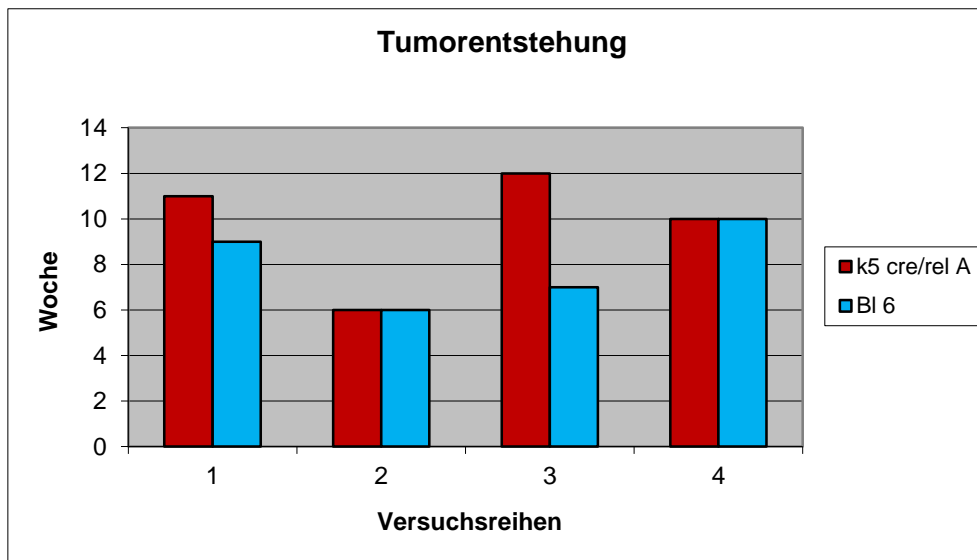


Abbildung 3.39: erstmalige Tumorentstehung bei der dreimaligen Auftragung des Tumorpromotors TPA pro Woche, Vergleich von Linie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* und Linie C57BL/6

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> 1 Versuchsreihe X 1 ₁
4 ♂ <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> TPA | <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Versuchsreihe X 1 ₂
4 ♀ C57BL/6 TPA |
| <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> 2 Versuchsreihe X 2 ₁
4 ♂ 2 ♀ <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> TPA | <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Versuchsreihe X 2 ₂
5 ♂ C57BL/6 TPA |
| <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> 3 Versuchsreihe X 3 ₁
1 ♂ 6 ♀ <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> TPA | <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Versuchsreihe X 3 ₂
3 ♂, 3 ♀ C57BL/6 TPA |
| <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: red; margin-right: 5px;"></div> 4 Versuchsreihe X 4 ₁
5 ♀ <i>RelA^{k5Δ/k5Δ}</i> TPA | <div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: blue; margin-right: 5px;"></div> Versuchsreihe X 4 ₂
5 ♂ C57BL/6 TPA |

Die nachfolgenden Abbildungen, Abbildung 3.40 bis Abbildung 3.43, zeigen eine zusammenfassende Übersicht über auftretende Todesfälle während der Versuche. Die Ergebnisse ähneln sich den Versuchsreihen, die zweimal pro Woche mit TPA behandelt wurden. Unabhängig von der Applikation von TPA oder Azeton hatten die transgenen Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen prozentual mehr Todesfälle zu verzeichnen.

	VR X 1 ₁	VR X 2 ₁	VR X 3 ₁	VR X 4 ₁
Anzahl Todesfälle / %	2 / 50 %	. / 0%	5 / 71 %	2 / 40%
geschlechtsbezogen	2 ♂	. / .	4 ♀ 1 ♂	2 ♀
Zeitraum	8.-24. Woche	. / .	3.- 11. Woche	12.-19. Woche

Abbildung 3.40: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* bei dreimaliger Applikation pro Woche mit TPA

	VR X 1 ₁	VR X 2 ₁	VR X 3 ₁	VR X 4 ₁
Anzahl Todesfälle / %	1 / 33%	1 / 33 %	2 / 100 %	4 / 100%
geschlechtsbezogen	1 ♀	1 ♂	2 ♂	4 ♂
Zeitraum	29. Woche	2 Woche	4.-5. Woche	3.- 13. Woche

Abbildung 3.41: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* bei dreimaliger Applikation pro Woche mit Azeton

	VR X 1 ₂	VR X 2 ₂	VR X 3 ₂	VR X 4 ₂
Anzahl Todesfälle / %	2 / 50 %	. / 0%	1 / 16%	. / 0%
geschlechtsbezogen	2 ♀	. / .	1 ♀	. / .
Zeitraum	8.-16. Woche	. / .	6. Woche	. / .

Abbildung 3.42: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei dreimaliger Applikation pro Woche mit TPA

	VR X 1 ₂	VR X 2 ₂	VR X 3 ₂	VR X 4 ₂
Anzahl Todesfälle / %	. / 0%	1 / 20%	. / 0%	. / 0%
geschlechtsbezogen	. / .	1 ♂	. / .	. / .
Zeitraum	. / .	23. Woche	. / .	. / .

Abbildung 3.43: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei dreimaliger Applikation pro Woche mit Azeton

3.2.1.2 Zusammenfassender Vergleich der Ergebnisse bei zweimaliger und dreimaliger/konzentrationserhöhter TPA-Applikation

Die Versuche haben gezeigt, dass die Wildtypmäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 zu einem früheren Zeitpunkt Papeln entwickelten als die transgenen Mäuse der Linie *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, unabhängig von der Frequenz und Konzentration von TPA. Ebenfalls unabhängig von der Frequenz und Konzentration von TPA beobachtete man die ersten Papeln der Mauslinie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* ca. 2-6 Wochen später. Jedoch konnten wir bei dreimaliger/konzentrationserhöhter TPA-Applikation zusätzlich feststellen, dass es bei beiden Mauslinien zum gleichen Zeitpunkt zur Entstehung von ersten Papeln kommen kann, die sich zu Tumoren

entwickeln können. Und eine erhöhte Frequenz und Konzentration bewirkte, dass beide Mauslinien zu einem noch früheren Zeitpunkt Papeln bildeten. Die beobachteten Hautveränderungen ähnelten sich hinsichtlich der unterschiedlichen TPA Applikation. Stärker betroffen, besonders von Hautentzündungen, waren die transgenen Mäuse. Bei der durchschnittlichen Papelgröße ergaben die Ergebnisse bei zweimaliger TPA-Applikation pro Woche, dass die Wildtypmäuse einen größeren Durchmesser zu verzeichnen hatten als die transgenen Mäuse. Die jeweilige Größe hing von der Dauer der TPA-Behandlung ab. Eine dreimalige und konzentrationserhöhte TPA-Applikation pro Woche bewirkte eine Zunahme des Papelwachstums und beide Mauslinien glichen sich hinsichtlich ihres durchschnittlichen Papeldurchmessers an. Des Weiteren machten wir die Beobachtung, dass zum Zeitpunkt der Anzeichen erster Papeln bei beiden Mauslinien tendenziell mehr Mäuse betroffen waren, wenn TPA mit erhöhter Konzentration dreimal pro Woche appliziert wurde. Am Ende jeder Versuchsreihe hat sich aber gezeigt, dass bei beiden Mauslinien verhältnismäßig bezogen auf die Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsreihe gleichviel und größtenteils über 50% Mäuse mit Tumoren induziert waren. Eine eindeutige Auswertung zu machen ist schwierig, da man das frühzeitige Ausscheiden von Versuchstieren durch Tod während des Versuches berücksichtigen muss. Das gilt auch, wenn man eine Aussage zu der Gesamtumoranzahl machen möchte. Anhand unserer Beobachtungen tendieren die Wildtypmäuse zu einer höheren Tumoranzahl pro Versuchsreihe. Und ein geringfügiger Anstieg der Tumoranzahl konnte bei Erhöhung der TPA Frequenz und Konzentration festgestellt werden.

3.3 Auswertung der Tumoranzahl und der Tumorgroße

Die Ergebnisse der Versuche haben gezeigt, dass es Unterschiede bei der Tumoranzahl und Tumorgroße gibt, wenn man beide Mauslinien vergleicht. Anhand ausgewählter Beispiele (Versuchsreihe B, X 2 und X 3) möchten wir die zu den oben genannten Größen gemachten Beobachtungen detaillierter beschreiben und grafisch darstellen.

3.3.1 Auswertung bei TPA-Applikation zweimal pro Woche

Abbildung 3.44 zeigt eine Übersicht über die Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe B 1, (*RelA^{k5Δ/k5Δ}*), pro Woche. In der 15. Woche der TPA-

Behandlung wurden erstmalig zwei Papeln mit einem Durchmesser von 0,1 cm beobachtet. Ein geringfügiges Wachstum konnte in den darauffolgenden Wochen bei einer Papel festgestellt werden. Ab der 20. Woche hatte sie eine Größe von 0,3 cm erreicht. Das plötzliche Verschwinden dieser Papel ist auf das Abkratzen durch die Maus zurückzuführen. In den folgenden Wochen beobachteten wir eine einzige Papel, die ihre Größe kaum veränderte und nach Beendigung der TPA-Behandlung in der 26. Woche Wachstumsstillstand aufwies. Erst in der 43. Woche kam es zum erneuten Wachstum.

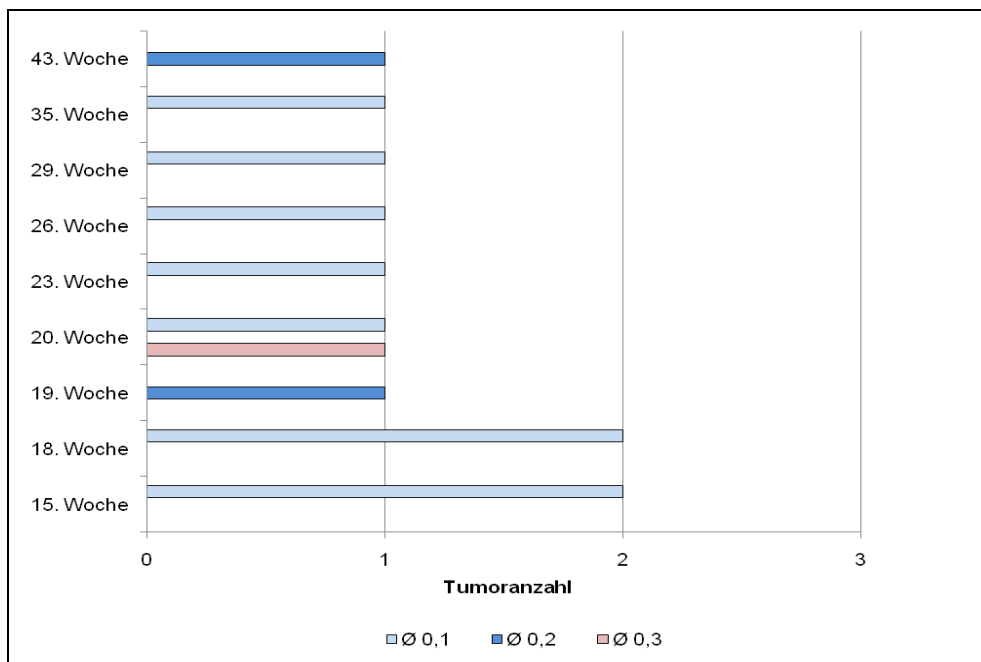


Abbildung 3.44: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe B 1, (*RelA^{k5Δ/k5Δ}*), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm

Zum Vergleich ziehen wir das Diagramm der Versuchsreihe B 2 (Linie: C57BL/6) heran, Abbildung 3.45. Bei den Wildtypmäusen werden bereits 2 erste Papeln mit der Größe 0,1 und 0,2 cm in der 13. Woche entdeckt. Die Tumoranzahl steigt in den nächsten Wochen stetig an. Außerdem konnten wir bei den Wildtypmäusen größere Papeldurchmesser feststellen (z.B. 0,7 cm in Woche 36). Das Wachstumsprofil verlief bei beiden Versuchsreihen ähnlich. Im Laufe der TPA-Behandlung nahm die Anzahl der Papeln zu und die Mehrzahl der Papeln wuchs stetig. Nach Abbruch der TPA-Behandlung in Woche 26 setzte ein langsamer Rückgang des Wachstums ein. Und es kam zu einer teilweise kontinuierlichen Rückbildung einzelner Papeln. Einige Wochen später konnten wir aber auch bei einem Teil der noch vorhandenen Papeln wieder ein Wachstum vermerken.

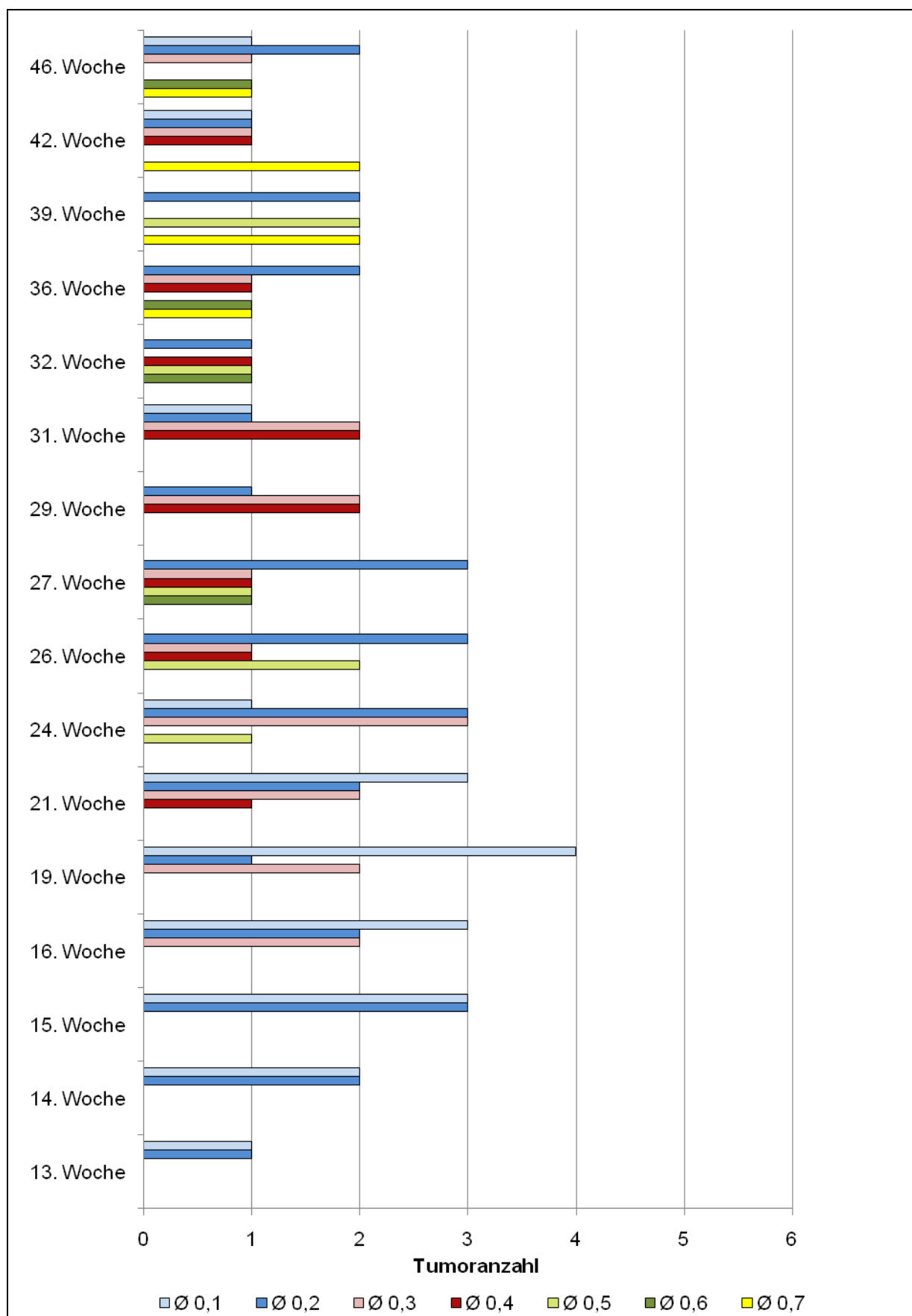


Abbildung 3.45: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe B 2, (C57BL/6), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm

Wir verdeutlichen dies nochmals in den nächsten Diagrammen, bei denen die Tumorentwicklung auf eine Maus bezogen dargestellt wird. Betrachtet man die Abbildung 3.46 und Abbildung 3.47, so fällt auf, dass sich bei der Wildtypmaus im Laufe des Versuches mehr Papeln entwickelt hatten, als bei der transgenen Maus. Während die transgene Maus in Abbildung 3.46 eine Papel durch mechanische Entfernung (Abkratzen) frühzeitig verlor und die Anzahl der Papeln unverändert blieb, ist im Diagramm von Abbildung 3.47 deutlich erkennbar, dass nach Beenden der TPA-Behandlung in Woche 26 die Papel-/Tumoranzahl bei der Wildtypmaus abnahm.

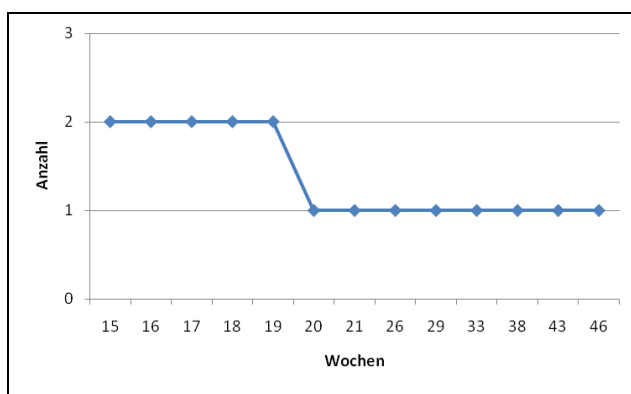


Abbildung 3.46: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: B 1), *RelA^{k5Δ/k5Δ}*

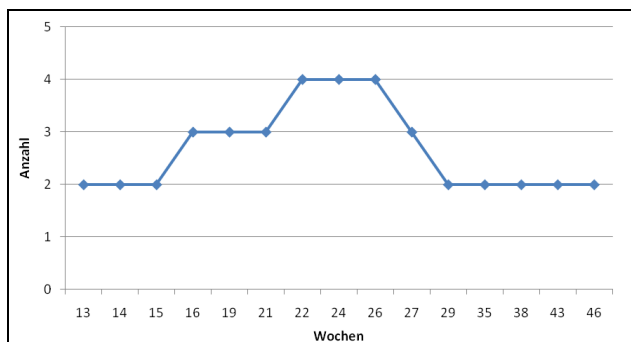


Abbildung 3.47: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: B 2), C57BL/6

Die Diagramme zur Größenentwicklung eines Tumors (Abbildung 3.48 und Abbildung 3.49) bestätigten unsere mehrfach gemachten Beobachtungen, dass bei vielen Tumoren ein stetiges Wachstum während der TPA-Behandlung erfolgte.

Bei der Versuchsreihe B 1 ziehen wir den größten Tumor als Beispiel heran, Abbildung 3.48, um dessen stetiges Wachstum darzustellen. Aufgrund der

mechanischen Entfernung des Tumors durch die Maus in der 20. Woche konnte dessen Weiterentwicklung nicht mehr verfolgt werden.

Abbildung 3.49 zeigt, dass es bei den Wildtypmäusen zu Beginn der TPA-Behandlung zu einem schnelleren Papelwachstum kam, der bis in Woche 27 anhielt. Nach Ende der Applikation des Tumorpromotors TPA in Woche 26 kam es zu einer Verkleinerung des Tumordurchmessers, der ab Woche 43 bei einem Wert von 0,2 cm stagnierte.

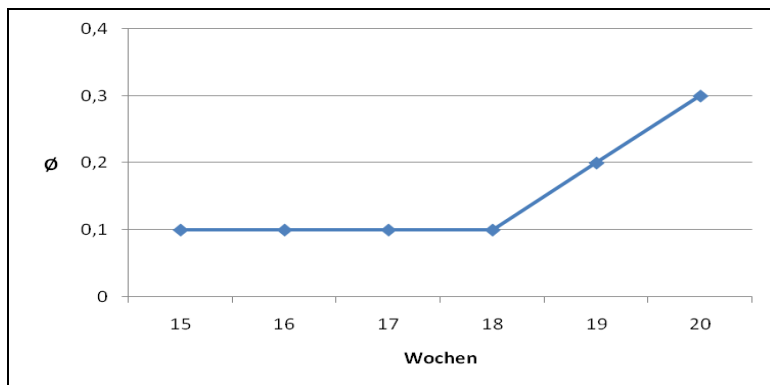


Abbildung 3.48: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: B 1), *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

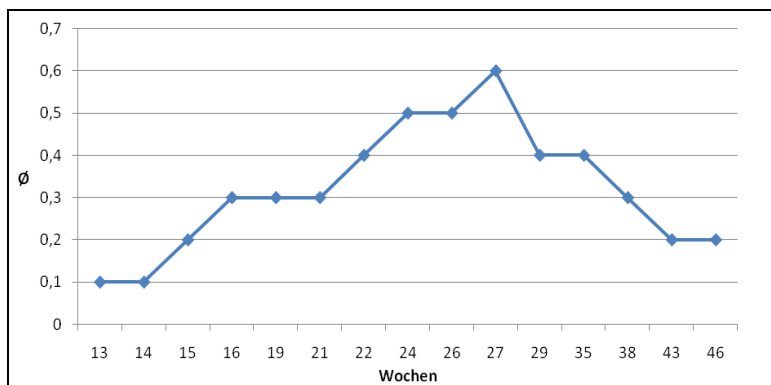


Abbildung 3.49: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: B 2), C57BL/6, Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

3.3.2 Auswertung bei TPA-Applikation dreimal pro Woche mit erhöhter Konzentration

Für die Auswertung der Tumoranzahl und Tumorgöße haben wir die Versuchsreihen X 2 und X 3 herangezogen, weil sich diese beiden Versuchsreihen bezüglich der erstmaligen Papelentwicklung im Vergleich von Wildtypmaus und transgener Maus

unterscheiden. Da stellt sich die Frage, wie es sich mit der Tumoranzahl und –größe verhält.

Abbildung 3.50 und Abbildung 3.51 zeigen den Verlauf von Tumoranzahl und Tumordurchmesser pro Woche der VR X 2. Beide Mauslinien entwickelten zum gleichen Zeitpunkt erstmalig Papeln. Zu Beginn der TPA-Behandlung ist bei beiden Mauslinien die Anzahl an Papeln relativ gleich, aber die Papeldurchmesser sind bei den transgenen Mäusen größer. Dieses Verhalten hatten wird bei der zweimaligen TPA-Applikation pro Woche umgekehrt beobachtet. Verfolgt man aber die Tumorentwicklung in den darauffolgenden Wochen, so stellt man fest, dass sich bei den Wildtypmäusen größere Tumore entwickelten und mehr Papeln/Tumore gezählt werden konnten. Das Beispiel Versuchsreihe X 2 hat gezeigt, dass die Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und Wildtypmäusen in Bezug auf die Tumorgöße und Tumoranzahl bei dreimal wöchentlicher Applikation und erhöhter Konzentration von TPA kleiner werden.

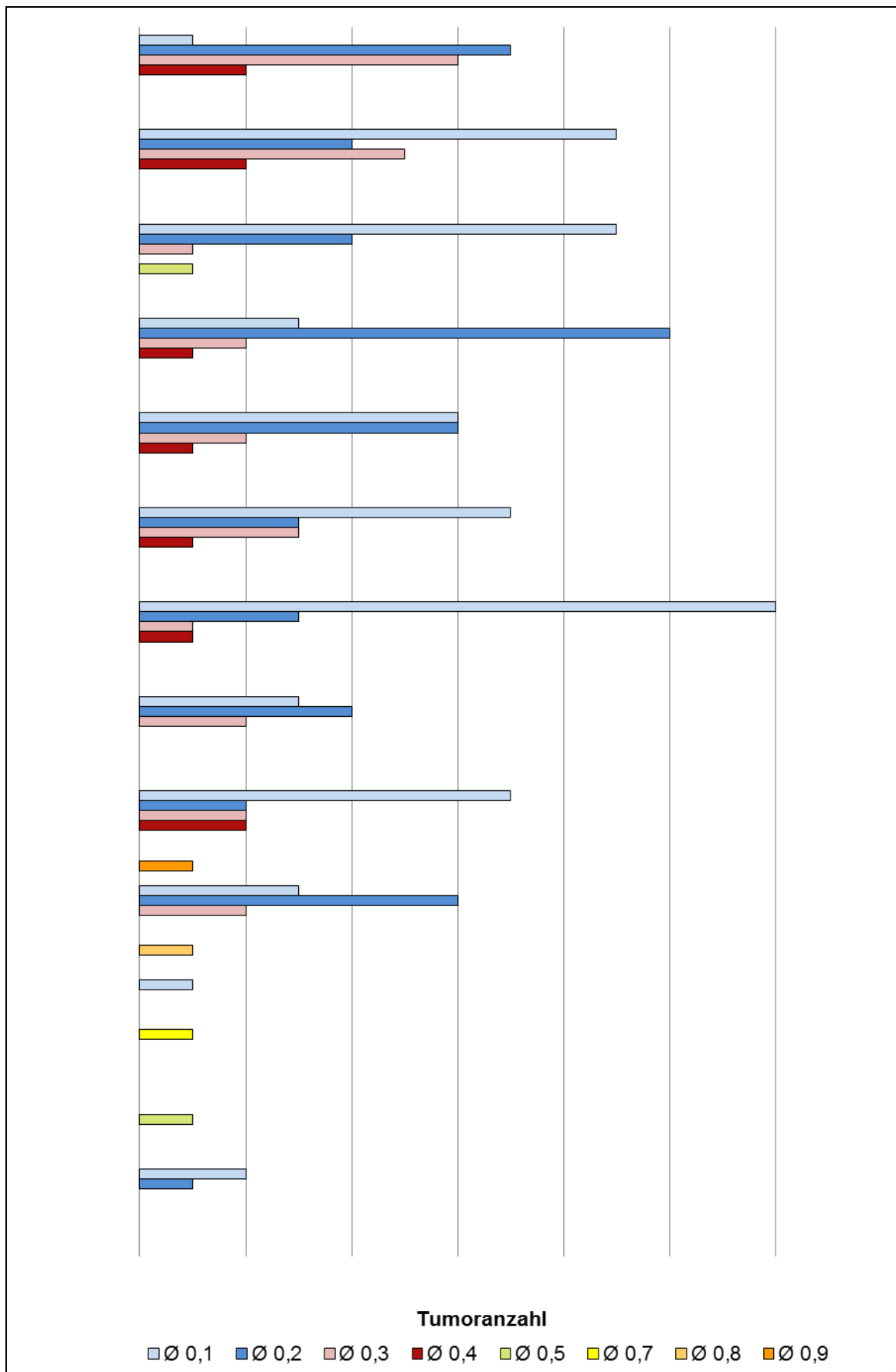


Abbildung 3.50: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 2₁, (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm

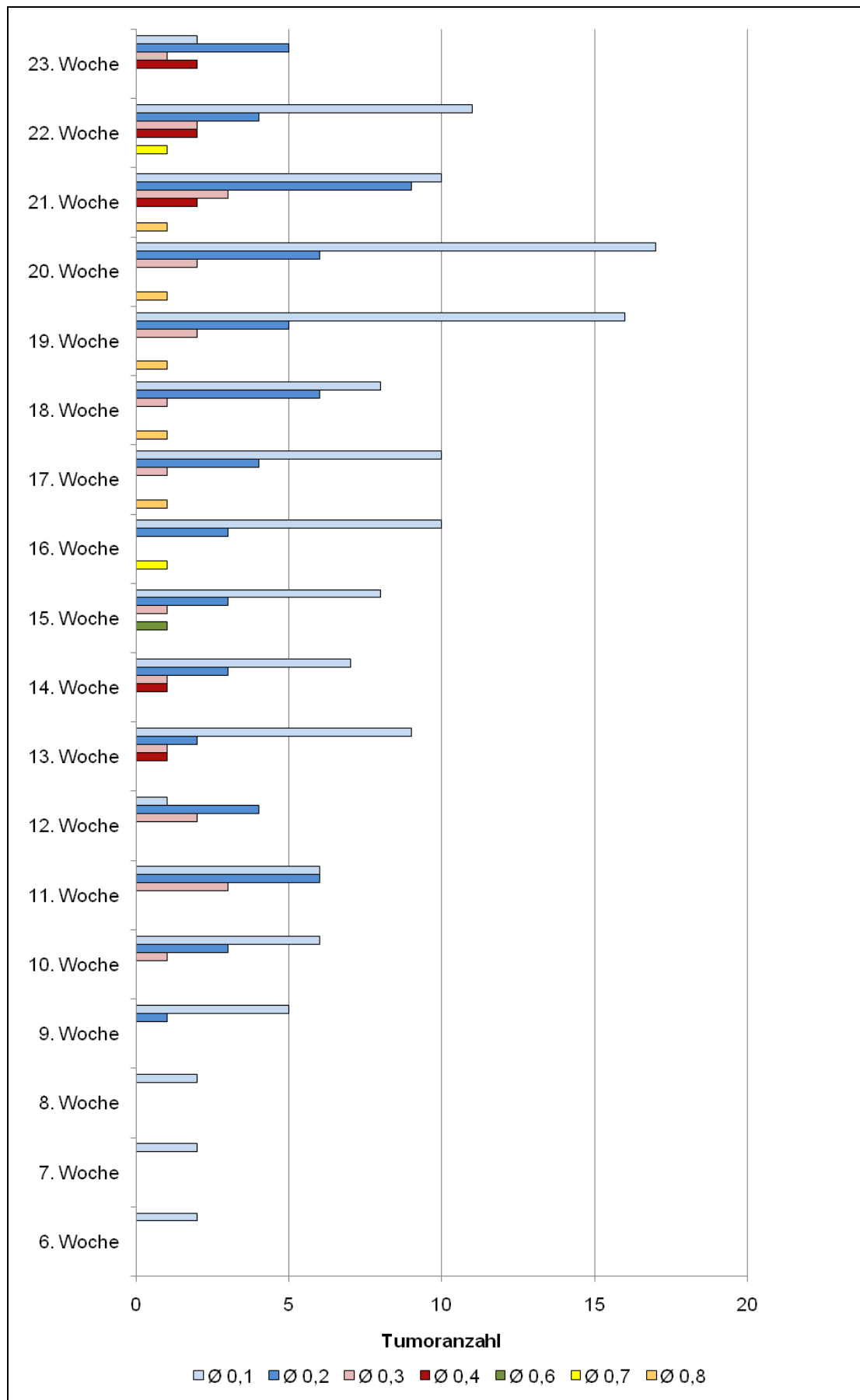


Abbildung 3.51: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 2₂, (C57BL/6), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm

Wir zogen für unsere Auswertung wieder die Entwicklung eines einzelnen Tumors und die Anzahl der Tumore im Laufe des Versuches pro Maus heran.

Abbildung 3.52 zeigt den rasanten Anstieg der Anzahl an Papeln/Tumoren nach 9 Wochen TPA-Behandlung bei einer transgenen Maus, der bei den Wildtypmäusen nicht so zu beobachten war.

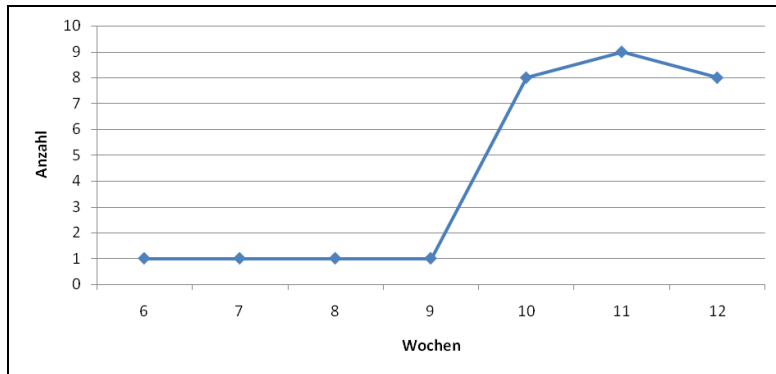


Abbildung 3.52: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 2₁), *RelA*^{k5Δ/k5Δ} (Maus scheidet während des Versuches aus)

In Abbildung 3.53 sieht man die Anzahl der Tumoren einer anderen Maus der Linie *RelA*^{k5Δ/k5Δ} im Verlauf des gesamten Versuches. Während der TPA-Behandlung war zweimal eine Abnahme der Tumoranzahl zu verzeichnen, die sich durch das mechanische Entfernen, wie zum Beispiel Abkratzen von den Mäusen selbst, erklären lässt. In der Woche 11 beobachtete man auch einen schnellen Anstieg der Tumoranzahl, ähnlich wie in Abbildung 3.52.

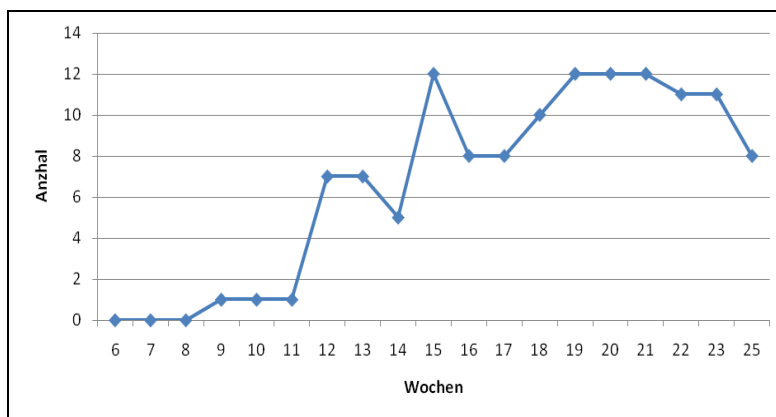


Abbildung 3.53: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 2₁), *RelA*^{k5Δ/k5Δ}

Nach Beendigung der TPA-Behandlung in Woche 20 kam es zur Reduzierung der Tumoranzahl.

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Linie C57BL/6 in Abbildung 3.54. Aber im Vergleich zu der transgenen Maus, Abbildung 3.53, konnten wir keine zeitgleichen und frühzeitigen starken Anstiege der Tumoranzahl beobachten. Erst in Woche 18, Abbildung 3.54, war dies bei den Wildtypmäusen zu verzeichnen.

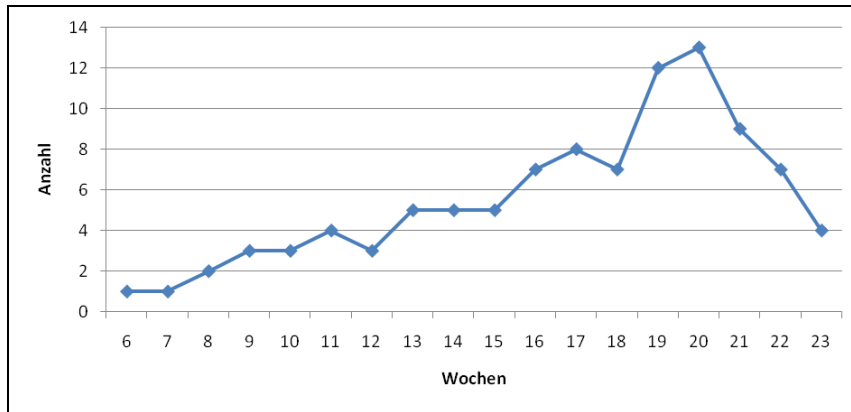


Abbildung 3.54: Anzahl der Tumore pro Maus (VR: X 2₂), C57BL/6

Machen wir noch einen Vergleich der beiden Mauslinien bezüglich der Größenentwicklung, siehe Abbildung 3.55 und Abbildung 3.56, so nahm bei beiden das Tumorstadium stetig zu. Bei der transgenen Maus setzte das Wachstum bereits frühzeitiger ein. Nach Abbruch der TPA-Applikation ab Woche 20 kam es wieder zu einer Verkleinerung des Tumordurchmessers, wenn auch verzögert wie bei Linie *RelA^{k5Δ/k5Δ}* in Abbildung 3.55 zu erkennen war.

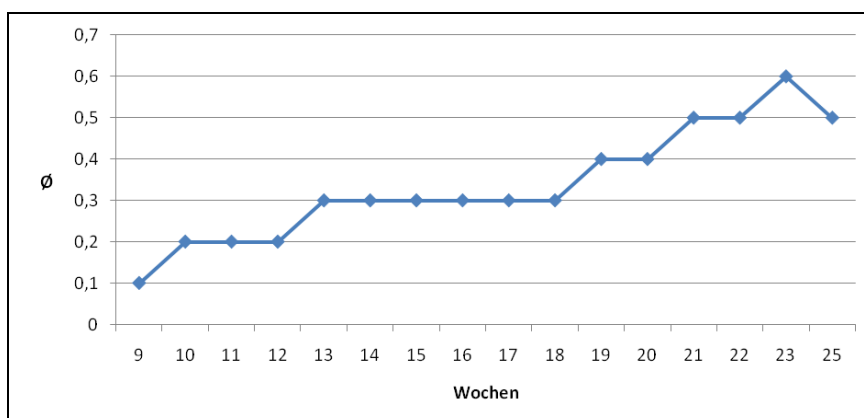


Abbildung 3.55: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 2₁), *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

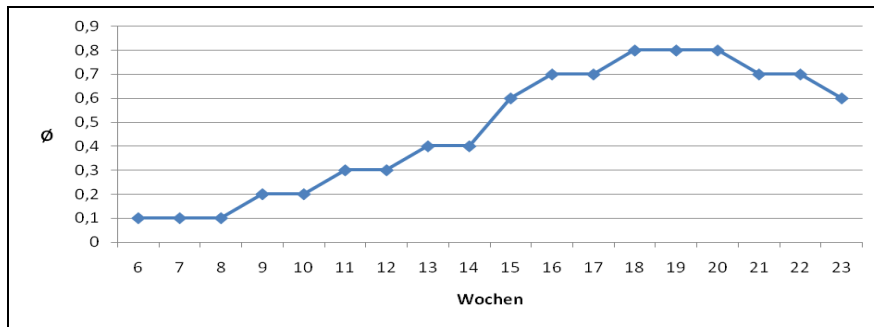


Abbildung 3.56: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 2₂), C57BL/6, Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

Bei der Versuchsreihe X 3 ist der Verlauf der Tumorentwicklung bei beiden Mauslinien ähnlich. Die Tumoranzahl und Tumorgöße nahm zu Beginn der TPA-Behandlung stetig zu und sank nach Abbruch der TPA-Behandlung in der 14. Woche, siehe Abbildung 3.57 und Abbildung 3.58. Die Versuchsreihe mit den Wildtypmäusen entwickelt verhältnismäßig mehr Papeln, auch wenn deren erstmalige Beobachtung 5 Wochen früher war als bei den transgenen Mäusen. Aber dagegen stieg die Papelanzahl bei den transgenen Mäusen verhältnismäßig geringfügig schneller in den ersten Wochen der TPA-Behandlung an.

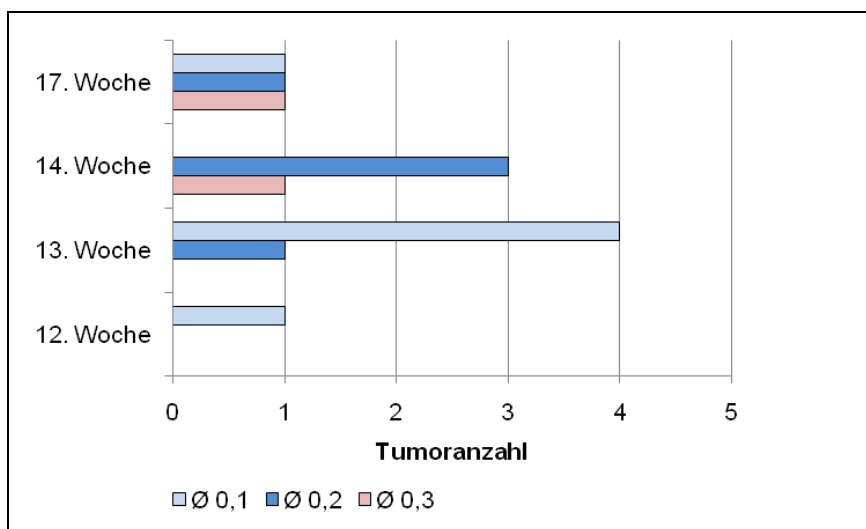


Abbildung 3.57: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 3₁, (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm

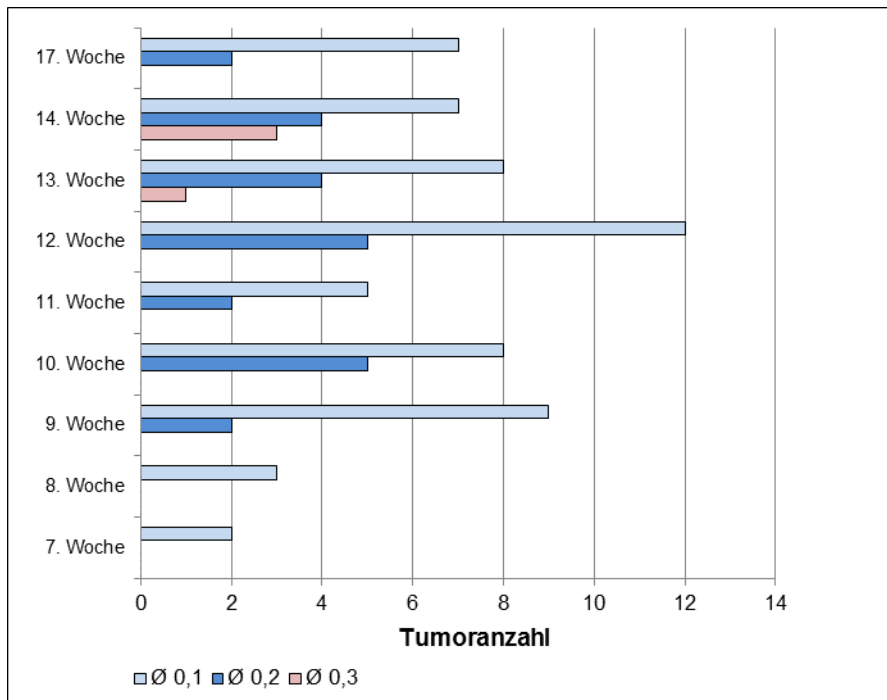


Abbildung 3.58: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 3₂, (C57BL/6), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors im cm

Der Blick auf Abbildung 3.59 und

Abbildung 3.60 zeigt, dass die Anzahl an Papeln/Tumoren pro Maus meistens bei den Wildtypmäusen deutlich höher im Vergleich zu den Knockout-Mäusen war. In Abbildung 3.60 schwankte die Anzahl während des Versuches ein wenig, aufgrund des wiederkehrenden Falls, das Abkratzen der Papeln durch die Mäuse selbst. Deutlich sieht man in Abbildung 3.60 wie die Tumoranzahl ab Woche 14 nach TPA-Applikationsabbruch abnimmt.

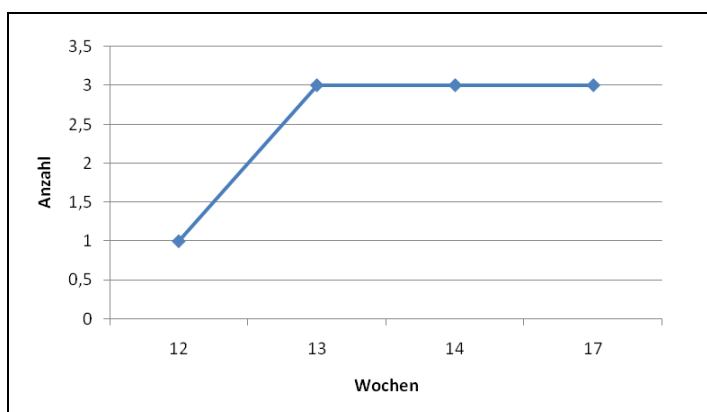


Abbildung 3.59: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 3₁), *RelA*^{k5Δ/k5Δ}

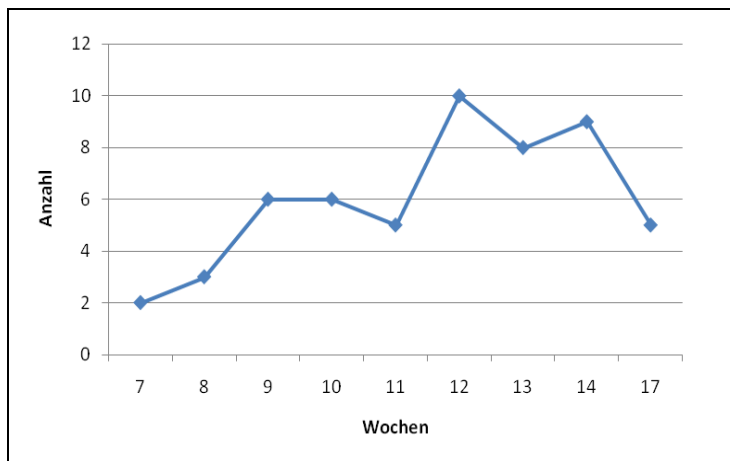


Abbildung 3.60: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 3 2), C57BL/6

In Abbildung 3.61 und Abbildung 3.62 sehen wir die Größenentwicklung eines Tumors von einer transgenen und einer Wildtyp-Maus. Bei beiden Mauslinien war ein stetiges Tumorwachstum während der TPA-Applikation zu beobachten. Ein schnelleres Tumorwachstum konnte bei der transgenen Maus festgestellt werden. Auch nach Ende der TPA-Applikation in Woche 14 wird der Tumor bei der Wildtypmaus kleiner, während das Tumorwachstum bei dieser transgenen Maus stagnierte.

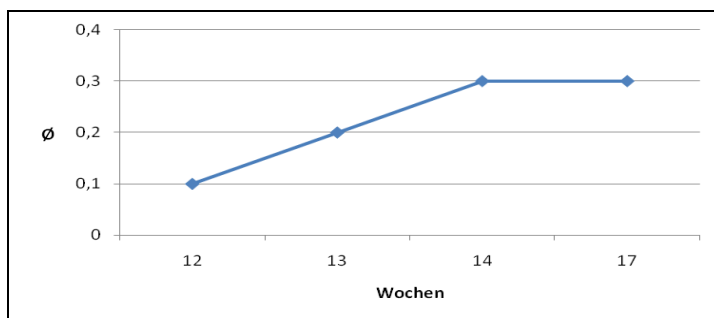


Abbildung 3.61: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 3 1), *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

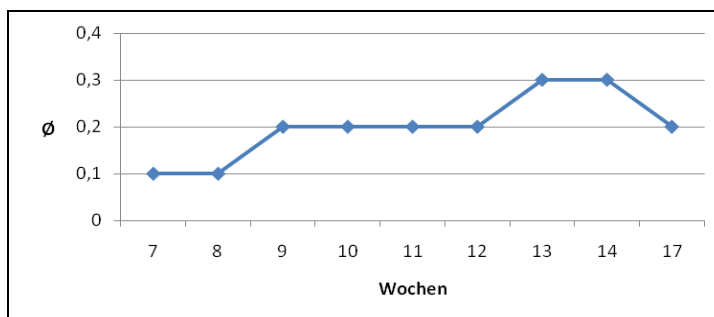


Abbildung 3.62: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 3 2), C57BL/6 Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm

Betrachtet man nun alle Ergebnisse im Zusammenhang, so stellte sich heraus, dass die Wildmäuse im Vergleich zu den transgenen Mäusen pro Versuchsreihe stets eine höhere Anzahl an Tumoren entwickelten. Die Tumoranzahl pro Maus war bei den Wildtypmäusen ebenfalls meistens höher. Gesamtbezogen auf alle durchgeführten Versuchsreihen war der Anteil an Mäusen (bei Wildtypmäusen und transgenen Mäusen innerhalb einer Versuchsreihe) größtenteils gleich, die nach TPA-Applikation Tumore ausbildeten. Weitere Unterschiede beobachteten wir bei den transgenen Mäusen nach konzentrationserhöhter und dreimaliger TPA-Applikation pro Woche. Hier kam es zu einem schnelleren Tumorwachstum und einem schnelleren Anstieg der Tumoranzahl in den Anfangswochen. Bezogen auf die Papeldurchmesser waren diese bei den Wildtypmäusen, die zweimal die Woche TPA bekamen, verhältnismäßig größer. Gravierende Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien bezüglich der durchschnittlichen Tumorgöße gab es nicht mehr, als TPA dreimal pro Woche aufgetragen wurde. Bei allen Versuchsreihen beobachteten wir nach Beenden der TPA - Applikation Stagnation im Wachstum der Tumore, über Verkleinerung bis hin zur Rückbildung.

3.4 Auswertung der histochemischen Färbungen

Die beobachteten Hautveränderungen haben gezeigt, dass NF- κ B/p65 (Rel A) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen und Tumoren spielt. Nun galt es zu klären, wann und in welcher Form, aktivierte oder inaktivierte, sich NF- κ B/p65 (Rel A) in den verschiedenen untersuchten Hautgeweben präsentierte, um Einblicke in den Mechanismus des Transkriptionsfaktors zu gewinnen. Des Weiteren bezogen wir den histochemischen Nachweis von c-jun und IKK α / β mit ein, um deren Einfluss bei der Tumorentstehung mit und ohne Vorkommen von NF- κ B/p65 (Rel A) in der Epidermis zu untersuchen. Für die Detektion der oben genannten Komponenten wurden das unter Punkt 2.8.3.2 beschriebene Färbeverfahren und die unter Punkt 2.2 angegebenen Antikörper verwendet.

3.4.1 Färbungen mit Antikörper NF- κ B p65 (A) : sc-109

Für den histochemischen Nachweis von NF- κ B/p65 (Rel A) in seiner inaktiven Form haben wir den Antikörper NF- κ B p65: sc-109 verwendet. Das Verdünnungsverhältnis

1:200 lieferte spezifische Färbungen. Zu erwarten ist eine Anfärbung des Zytoplasmas, wo die inaktive Form von NF- κ B/p65 vorliegt. Gut erkennbar ist die nicht angefärbte Epidermis von den Knockout-Mäusen (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}), (Abbildung 3.63; Abbildung 3.65, links oben). Dies bestätigt die Deletion des Gens *RelA* in der Epidermis der *RelA*^{k5Δ/k5Δ} Mäuse. Der verwendete Antikörper verursacht demzufolge keine Anfärbung der Epidermis bei den Knockout-Mäusen. Bei der Wildtypmaus sind sowohl Epidermis als auch Dermis intensiv angefärbt, (Abbildung 3.65, links unten). Weiterhin kann man bei beiden Mauslinien beobachten, dass das Zytoplasma von gesunden Hautzellen stärker angefärbt ist. Dagegen fällt im kranken Hautgewebe (Tumor) die Anfärbung des Zytoplasmas nicht ganz so intensiv aus. (Vergleich: Abbildung 3.64 und Abbildung 3.65).

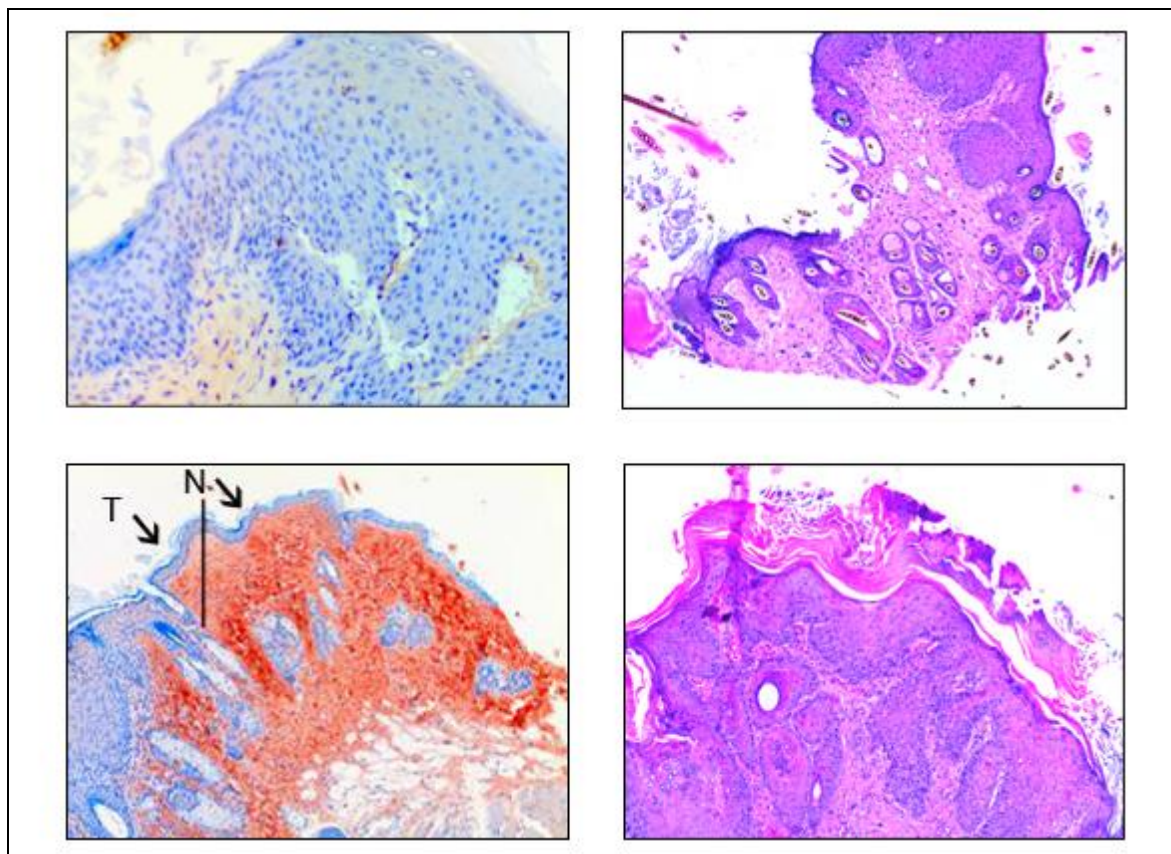


Abbildung 3.63: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase der beiden Gewebe

oben: Färbung mit AK NF- κ B p65 sc-109, 1:200, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor, daneben HE-Färbung

unten: Färbung mit AK NF- κ B p65 sc-109, 1:200, C57BL/6, Tumor, daneben HE-Färbung

In der Abbildung 3.63, oben links, sehen wir einen Teil des Hautquerschnittes, entnommen aus Tumorgewebe, von einer Knockout-Maus (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}). Es ist eine

verbreiterte Epidermis erkennbar, die im Vergleich zu der Dermis nicht angefärbt ist. Werfen wir einen Blick auf den Hautabschnitt von einer Wildtypmaus, Abbildung 3.63 links unten, so ist ein deutlicher Unterschied zwischen Tumorgewebe und normaler, gesunder Haut erkennbar. Morphologisch ist beim Tumorgewebe ein akantotisch verbreitetes Epidermisband mit leichter Schichtungsunregelmäßigkeit zu beobachten. Dagegen zeigt die normale Haut zum rechten Bildrand hin eine unveränderte lokalisationstypische Epidermis. Betrachtet man die Färbereaktionen, so ist das Zytoplasma in der Dermis der normalen Haut stärker angefärbt, als im Bereich des Tumorgewebes. Dagegen ist ein Teil der Epidermis im Tumorgewebe intensiver gefärbt im Vergleich zur normalen Haut (Übergangszone zum Tumorgewebe), wo die Färbung fast negativ ausfällt.

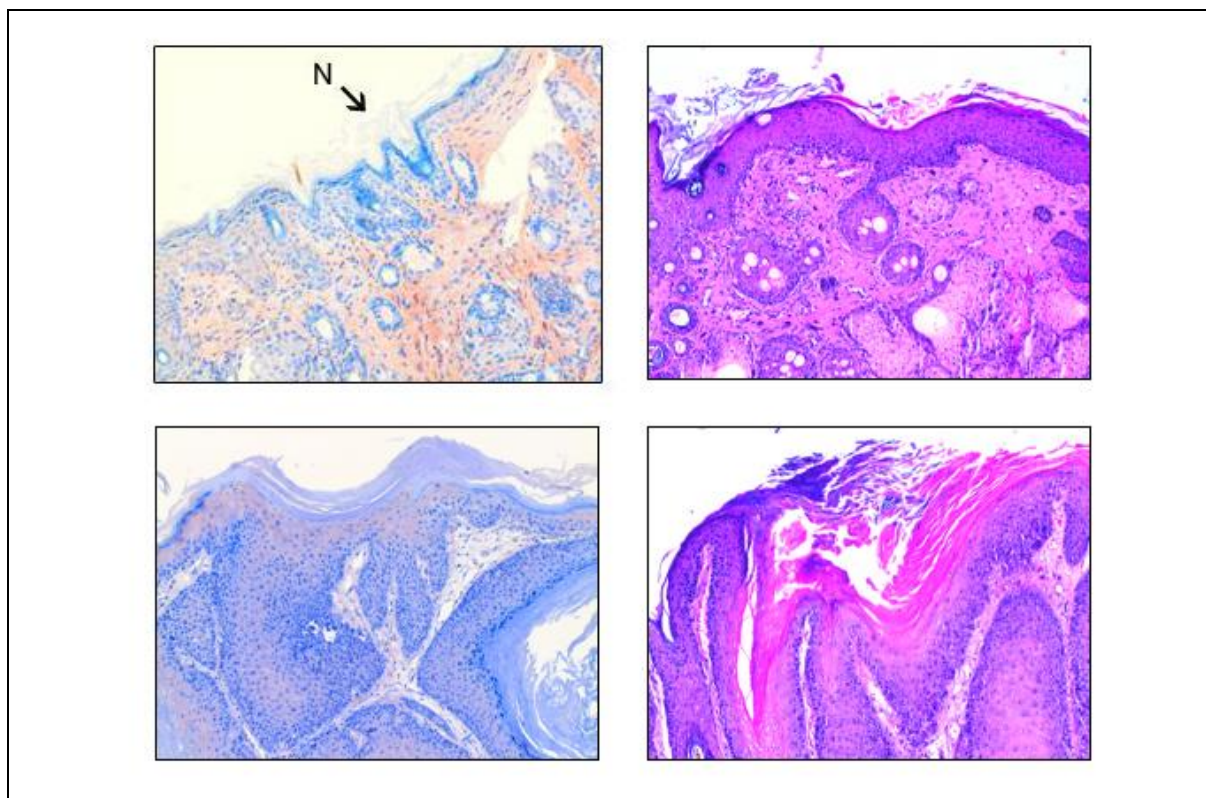


Abbildung 3.64: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: N: normales gesundes Hautgewebe

oben: Färbung mit AK NF-κB p65 sc-109, 1:200, *ReIA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor

Am linken Bildrand: Akanthotisch verbreitetes Epidermisband mit Hypergranulose (epidermale Hyperplasie). Daneben: HE-Färbung

unten: Färbung mit NF-κB p65 sc-109, 1:200, C57BL/6, Tumor

Endophytische Proliferation größerer Keratinozytenverbände unter Ausbildung von Hornzysten. Hyperplasie basaloider Keratinozyten, Schichtungsunregelmäßigkeiten. (Plattenepithelkarzinom) Rechts daneben HE-Färbung

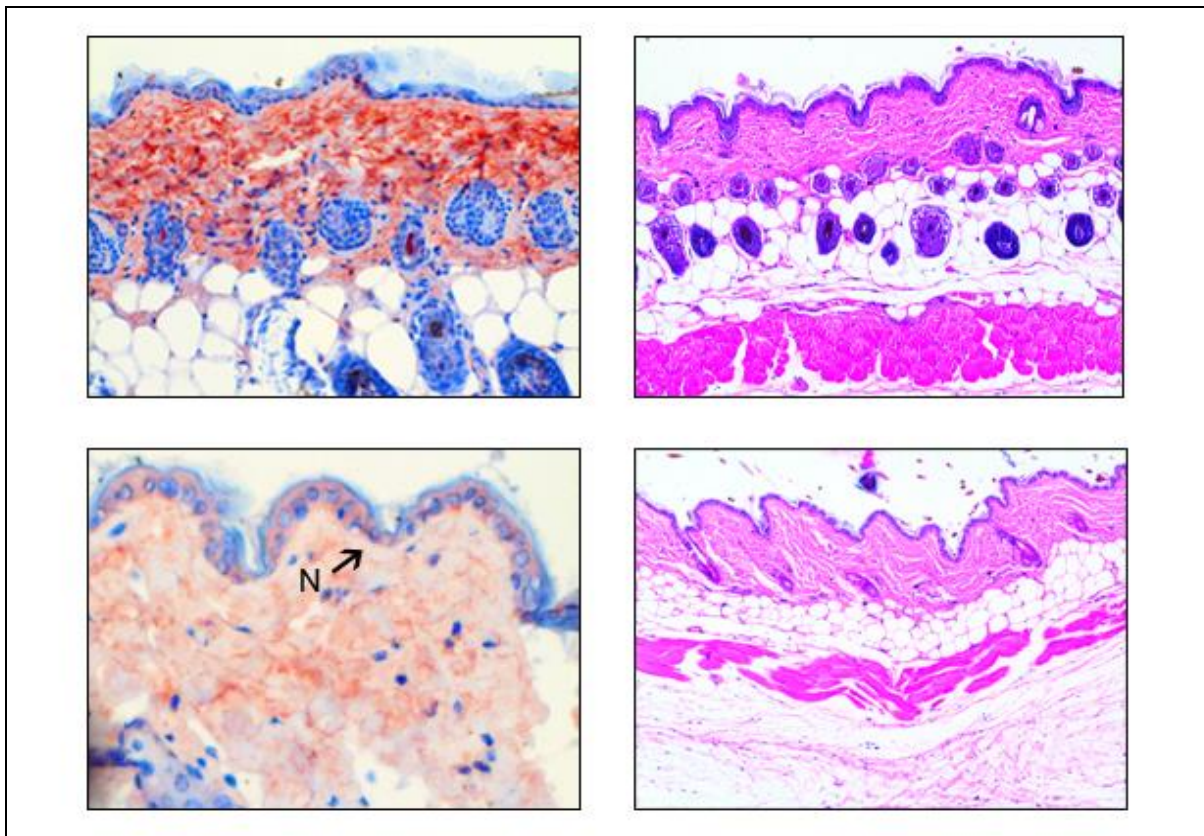


Abbildung 3.65: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: N: normales gesundes Hautgewebe

oben: Färbung mit AK NF-κB p65 sc-109,1:200, *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*, normale Haut (Reagens: Azeton dient als Kontrollreagens, welches keine Hauttumoren auslöst)

rechts daneben: HE-Färbung

unten: Färbung mit AK NF-κB p65 sc-109,1:200, C57BL/6, normale Haut (Reagens: Azeton) Sehr flaches, jedoch morphologisch weitgehend unauffälliges Epidermisband. Keine epitheliale Neoplasie erkennbar.

rechts daneben: HE-Färbung

Den umgekehrten Fall sehen wir in Abbildung 3.64 und Abbildung 3.65 (links unten). Die Epidermis von normaler, gesunder Haut (Applikation mit Azeton) ist intensiver angefärbt, als die bereits morphologisch veränderte Epidermis. Eine Translokation von NF-κB/p65 vom Zytoplasma in den Zellkern erfolgt nicht. Dies ist anhand der negativen Färbung der Zellkerne zu erkennen.

Zusammenfassend haben diese histochemischen Färbungen gezeigt, dass in den Knockout-Mäusen das Gen *reIA* deletiert wurde. Zusätzlich sei erwähnt, dass mittels PCR der Genotyp von Knockout-Mäusen und Wildtypmäusen ermittelt und überprüft wurde. Abbildung 3.68 bestätigt das Vorhandensein von *ReIA* in den für die Versuche verwendeten Wildtypmäuse. Zur Generierung von Mäusen, bei denen *ReIA* epidermisspezifisch deletiert ist, wurden Mäuse mit geflochtenen *ReIA*-Allelen, (*ReIA^{f/f}*), mit Keratin5-Cre Mäusen verpaart. Mäuse mit und ohne epidermis-

spezifischer Deletion von *RelA* unterscheiden sich phänotypisch nicht, deshalb kann u.a. die histochemische Färbung als Nachweis herangezogen werden.

Es wurde außerdem gezeigt, dass die inaktive Form von NF- κ B/p65 nicht im Zellkern vorkam und verstärkt im Zytoplasma vorlag. Phasenabhängig konnte sie zudem in krankem Hautgewebe nachgewiesen werden.

Tumorentwicklung auf der Haut bei einer Knockout-Maus und Wildtyp-Maus



Abbildung 3.66: links: Knockout-Maus (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}), rechts: Wildtyp-Maus (C57BL/6), beide haben Tumor auf dem Rücken

Haut/Fell einer Wildtyp-Maus nach Azeton-Behandlung

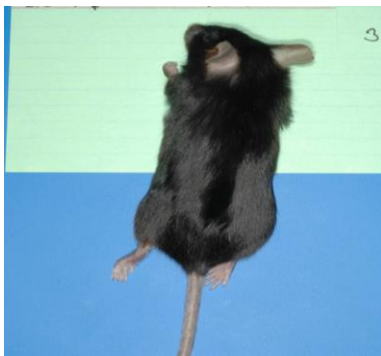


Abbildung 3.67: Wildtypmaus (C57BL/6), behandelt mit dem Kontrollreagens Azeton
Keine besonderen Auffälligkeiten

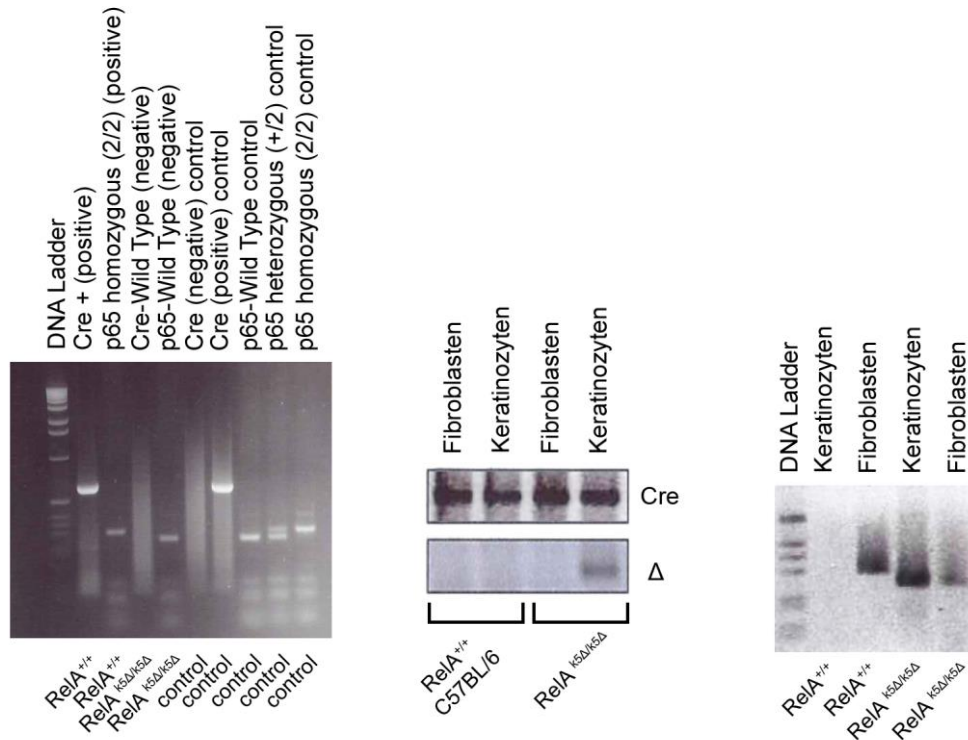


Abbildung 3.68: Epidermisspezifische Inaktivierung von *RelA* erfolgte durch das K5-cre-Transgen (Abb. links und Mitte). Die Genotypisierung mittels PCR zeigte eine gewebespezifische Deletion von *RelA* in der Haut, speziell in den Keratinozyten (mittleres und rechtes Bild)

3.4.2 Färbungen mit Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser276)

Bei zahlreichen Entzündungsprozessen konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B/p65 hier verstärkt in seiner aktivierten Form vorliegt. Anhand der folgenden histochemischen Färbungen sollte dies bestätigt werden. Die Umwandlung von der inaktivierten in die aktivierte Form erfolgt durch Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren des Proteins. Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Färbungen wurden Antikörper verwendet, die aktiviertes NF- κ B/p65 (Rel A) im Zytoplasma und im Zellkern, in Abhängigkeit von seiner phosphorylierten Aminosäure im Molekül, detektieren. Der Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser276) erkennt das aktivierte NF- κ B/p65 anhand des phosphorylierten Serin276. Abbildung 3.69, oben links, zeigt ein Papillom von einer transgenen Maus. Morphologisch betrachtet, erkennt man ein unregelmäßiges akantotisch verbreitertes Epidermisband mit Hypergranulose und Hyperkeratose. Des Weiteren beobachtet man basale Schichtungsunregelmäßigkeiten. Das Färbeverhalten der Epidermis ist negativ. Dagegen ist die Dermis angefärbt, wodurch die Aktivierung von NF- κ B/p65

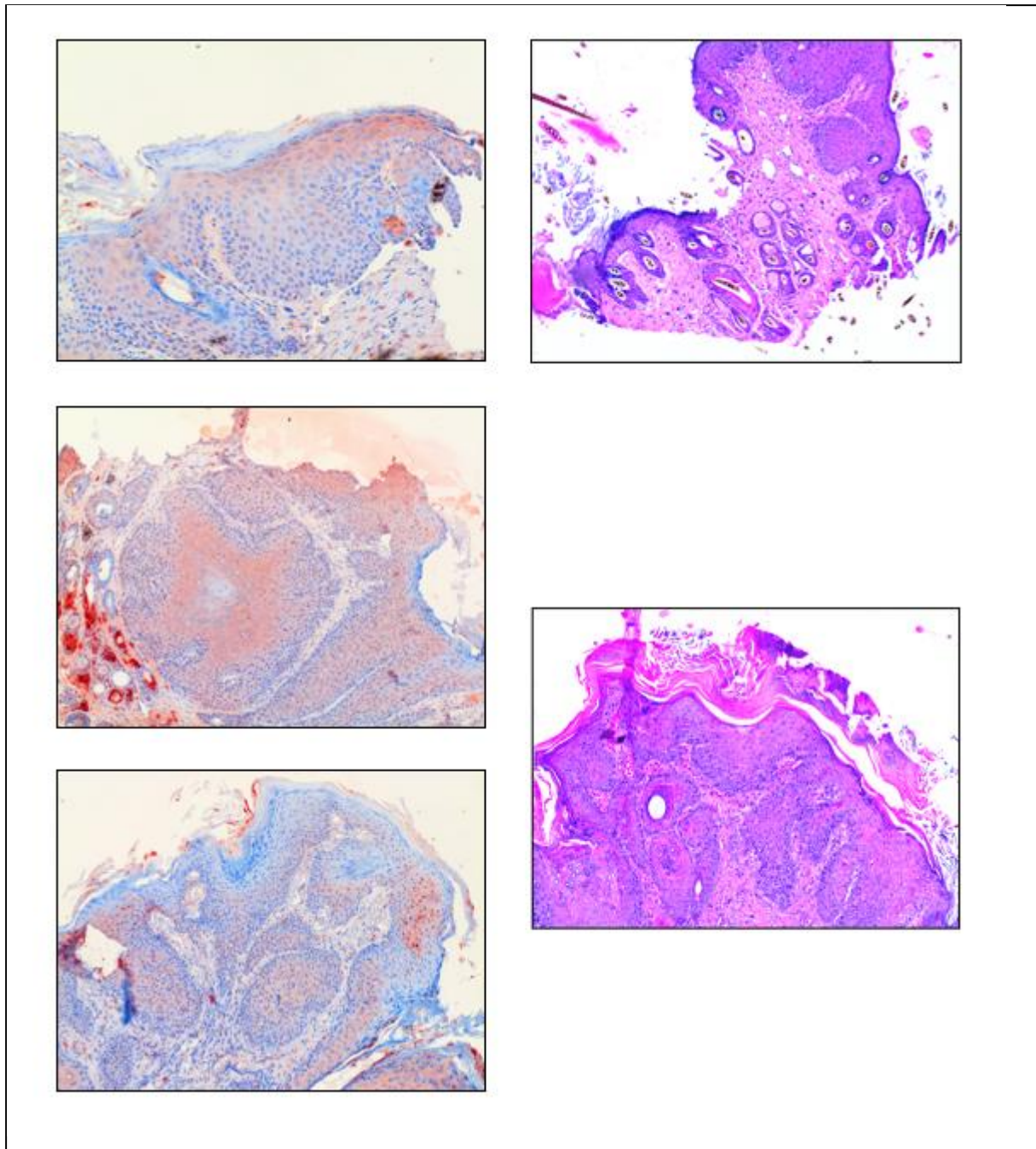


Abbildung 3.69: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

links oben: Färbung mit AK p- NF-κB p65 (Ser276), 1:25, *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*, Tumor

rechts oben: HE-Färbung

links (mittig und unten): Färbung mit AK p- NF-κB p65 (Ser276), 1:25, C57BL/6, Tumor

mittig: Plattenepithelkarzinom: Negatives Färbeverhalten der basalen Zellschicht. Zunehmende zytoplasmatische Färbung in den apikaleren Zellschichten.

unten: Plattenepithelkarzinom: Weitgehender Verlust einer zytoplasmatischen Färbung, sowie der Kernfärbung.

rechts mittig: HE-Färbung

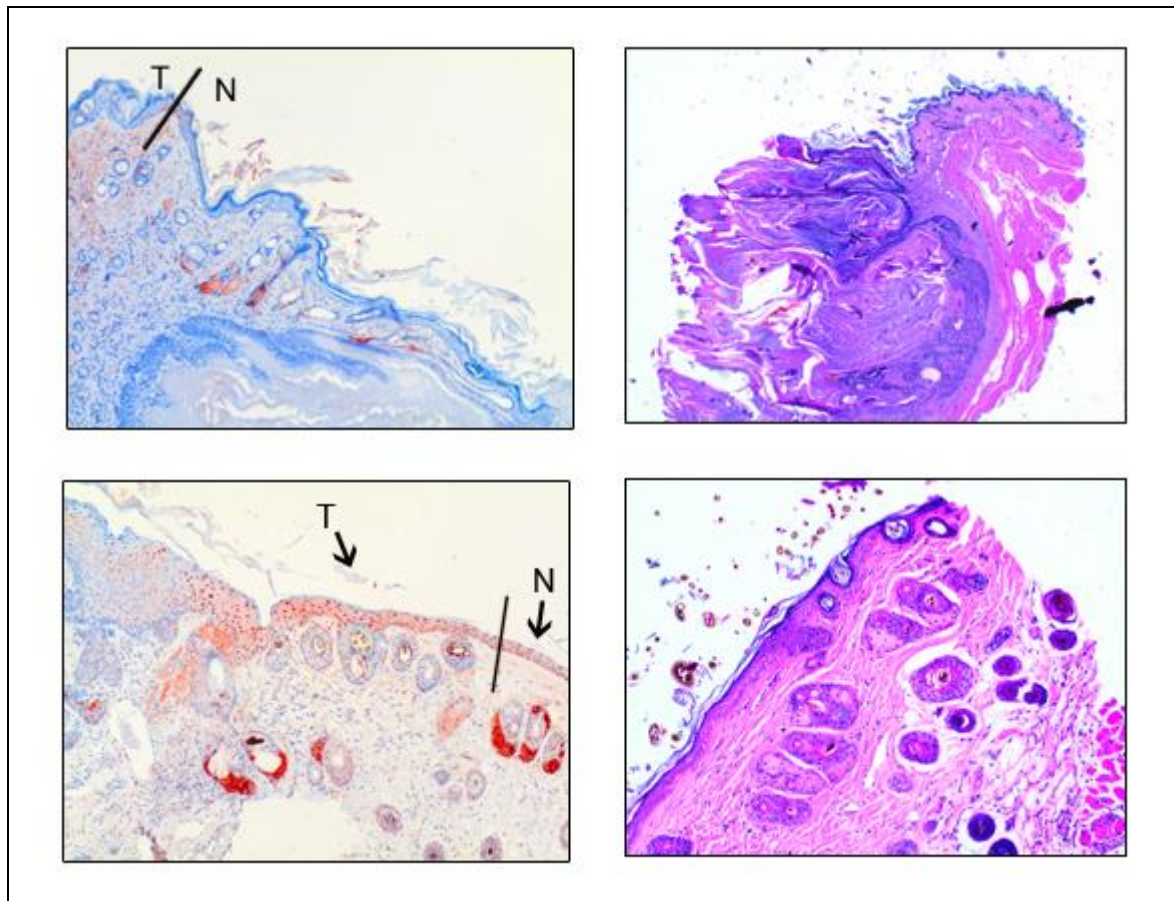


Abbildung 3.70: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase der beiden Gewebe

links oben: Färbung mit AK p- NF-κB p65 (Ser276), 1:25, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumorgewebe und normale Haut

Rechte Bildhälfte: Unveränderte Epidermis, linker Bildrand akantotisch verbreitertes Epidermisband, einer epidermalen Hyperplasie entsprechend

rechts oben: HE-Färbung

links unten: p- NF-κB p65 (Ser276), 1:25, C57BL/6, Tumor und normale Haut

rechts unten: HE-Färbung

(RelA) in der Phase der Tumorprogression bestätigt wird. Eine schwache Färbung ist in den Zellkernen zu erkennen.

Die Abbildung 3.69 links Mitte und unten zeigt den histologischen Schnitt von Tumorgewebe einer Wildtypmaus (C57BL/6). Sehr deutlich ist hier das Plattenepithelkarzinom erkennbar. In dem mittleren Bild ist ein negatives Färbeverhalten der basalen Zellschicht mit zunehmender zytoplasmatischen Färbung in den apikalen Zellschichten zu beobachten. Die intensive Färbung der Zellkerne deutet auf eine hohe Konzentration an phosphorylierten RelA hin. Im Vergleich dazu zeigt das untere Bild ein Tumorstadium mit weitestgehenden Verlust einer zytoplasmatischen Färbung, sowie der Kernfärbung. In der Abbildung 3.70, oben

links, sieht man kranke und gesunde Hautabschnitte einer Knockout-Maus (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}), die wochenlang mit TPA behandelt wurde. Die gesunden Hautpartien zum rechten Bildrand hin präsentieren eine unveränderte Epidermis. Die Färbung fällt negativ aus, aufgrund der Deletion von *RelA*. Aber auch die Dermis ist im gesunden Hautabschnitt nicht angefärbt. Werfen wir einen Blick auf den oberen linken Bildrand, so ist eine epidermale Hyperplasie deutlich erkennbar und auch die Dermis zeigt jetzt positives Färbeverhalten. Zum Vergleich ziehen wir wieder die Wildtypmaus heran, deren Haut auf dem unteren Bild der Abbildung 3.70 zu sehen ist. Man erkennt die intensive Färbung des Zytoplasmas und der Zellkerne der Epidermis im Bereich des Tumorgewebes. Aber auch das normale, gesunde Gewebe zeigt ein intensives Färbeverhalten des Zytoplasmas und der Zellkerne in der Epidermis und Dermis. Betrachten wir den oberen, linken Bildrand, so ist ein zunehmender Verlust der Kernfärbung, bei relativem Verlust der zytoplasmatischen Anfärbbarkeit der Epidermis, zu erkennen. Hier handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Tumorstadium, in dem das phosphorylierte NF-κB/p65 herunter reguliert wurde.

3.4.3 Färbungen mit Antikörper Phospho-NF-κB p65 (Thr435)

Das phosphorylierte Threonin beim aktivierten NF-κB/p65 ist das Antigen für den Antikörper Phospho-NF-κB p65 (Thr435). Zur Verdünnung wurde das Verhältnis 1:10 gewählt.

Erwartet wird eine Anfärbung der Zellkerne und des Zytoplasmas, da, wie bereits erwähnt, aktiviertes NF-κB-p65 sich in beiden Zellkompartimenten befindet.

In Abbildung 3.71, oben links, sehen wir Tumorgewebe einer transgenen Maus (*RelA*^{k5Δ/k5Δ}). Die oberen Zellschichten der Epidermis sind negativ gefärbt. Dagegen ist ein zytoplasmatisches Färbemuster im Stratum spinosum, mit teils leichter Färbereaktion der Zellkerne zu kennen. Diese Beobachtung machen wir auch in der mittleren Abbildung und führen dies auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurück.

Der Bild links unten in Abbildung 3.71 zeigt zum Großteil Tumorgewebe einer Wildtypmaus. Zu beobachten ist das akanthtisch verbreiterte Epidermisband, entsprechend einer ausgeprägten epidermalen Hyperplasie. Weiterhin fällt eine zytoplasmatische Anfärbung suprabasaler Keratinozyten auf, während die basale Schicht negativ ist. Der Bereich der normalen, gesunden Haut ist deutlich schwächer gefärbt.

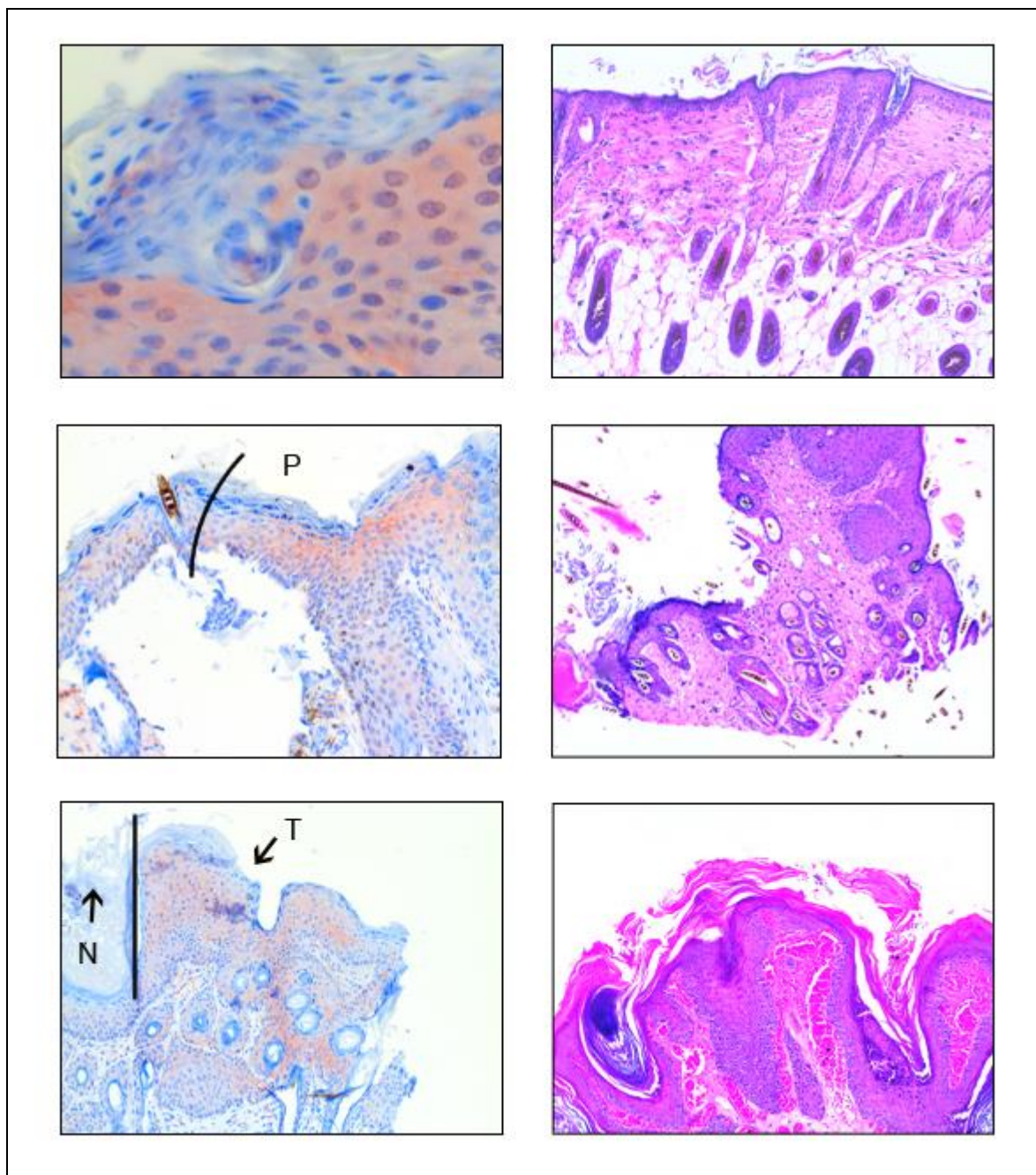


Abbildung 3.71: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; P: Plattenepithelkarzinom; schwarze Linie: Übergangsphase von zwei Gewebszuständen

links oben: Färbung mit AK p- NF-κB p65 (Ser435), 1:10, *ReIA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor

rechts oben: HE-Färbung

links mittig: p-NF-κB p65 (Ser435), 1:10, *ReIA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor, Akanthotisch verbreitertes Epidermisband mit Hypergranulose

rechts mittig: HE-Färbung

links unten: p-NF-κB p65 (Ser435), 1:10, C57BL/6, Tumor und normale Haut

rechts unten: HE-Färbung

3.4.4 Färbungen mit Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser468)

Für einen weiteren Vergleich wählten wir den Antikörper Phospho-NF- κ B p65 (Ser468) aus, der das aktivierte NF- κ B/p65 anhand des phosphorylierten Serin468 erkennt. Als geeignete Verdünnung fanden für das Verhältnis 1:5. Histochemische Färbungen mit diesem Antikörper sind im Zytoplasma und im Zellkern zu erwarten. Schaut man sich die immunhistochemischen Färbungen an, so ist auch hier keine eindeutige Auswertung möglich.

Obwohl in Abbildung 3.72, links oben, die Epidermis ungefärbt sein sollte, präsentiert sich der Schnitt zur Hälfte mit zytoplasmatischen Färbeverhalten von Keratinozyten. Auf dem Bild in der Mitte links von Abbildung 3.72 sieht man einen vergrößerten Ausschnitt der oberen mikroskopischen Aufnahme. Hier sind die Keratinozyten weitgehend ungefärbt. Im Vergleich dazu zeigt der histochemische Schnitt einer Wildtypmaus, (Abbildung 3.72 links unten), eine zytoplasmatische Färbung suprabasaler Keratinozyten. Sowohl die basale Zellreihe, als auch die Zellen des Stratum granulosums sind negativ.

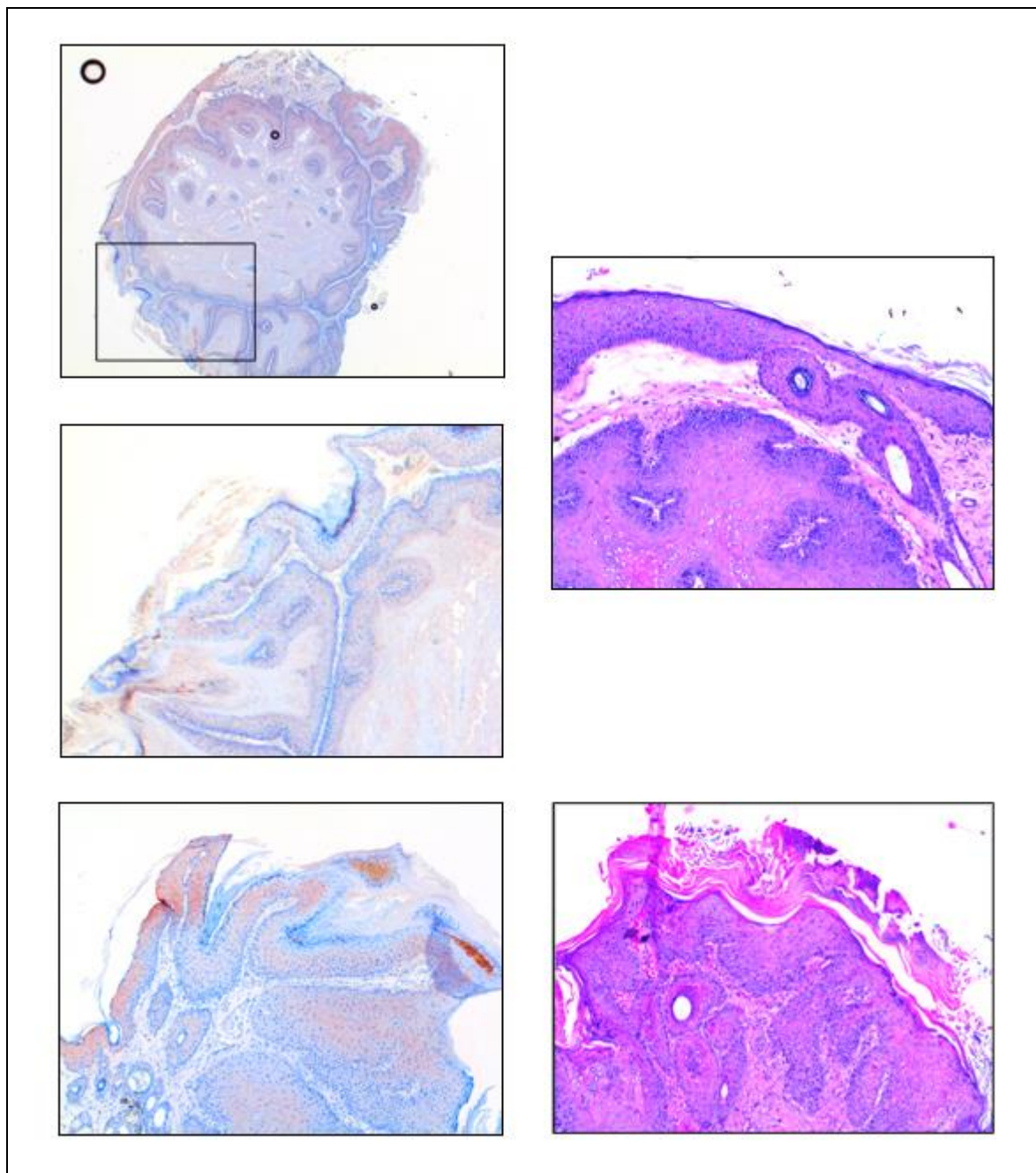


Abbildung 3.72: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

links oben: Färbung mit AK p-NF-κB p65 (Ser468), 1:10, *ReIA*^{k5Δ/k5Δ}, Plattenepithelkarzinom

links mittig [Ausschnitt von Foto oben]: Färbung mit AK p-NF-κB p65 (Ser468), 1:10, *ReIA*^{k5Δ/k5Δ}, Plattenepithelkarzinom

rechts mittig: HE-Färbung

links unten: p-NF-κB p65 (Ser468), 1:10, C57BL/6, Plattenepithelkarzinom

rechts unten: HE-Färbung

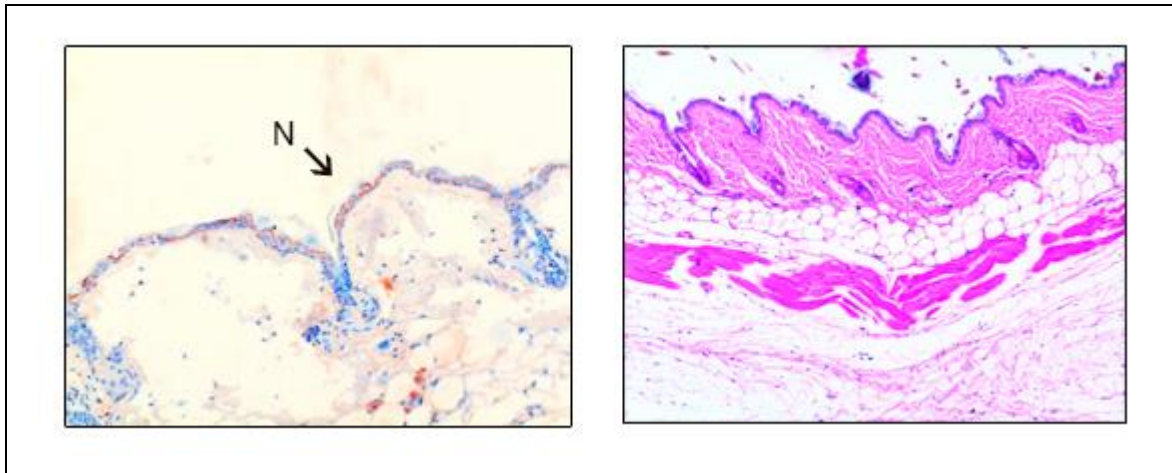


Abbildung 3.73: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: normales gesundes Hautgewebe

links: p-NF-κB p65 (Ser468), 1:10, C57BL/6 (Reagens: Azeton) normale, gesunde Haut, morphologisch unauffällige Epidermis, dient zur Kontrolle (Lösungsmittel Azeton für DMBA und TPA, löst keine Tumorentstehung aus) Färbung des Stratum corneums und der unteren Schichten, könnte auf leichte Hautreizungen und Entzündungen hinweisen, verursacht durch mechanische Verletzung

rechts: HE-Färbung

In Abbildung 3.73 sehen wir den histochemischen Schnitt einer mit Azeton behandelten Wildtypmaus. Azeton ist das Lösungsmittel von DMBA und TPA und löst keine Tumorentstehung aus. Es ist eine normale und gesunde Haut mit einer morphologisch unauffälligen Epidermis zu erkennen.

Zusammenfassend konnte mit den histochemischen Färbungen bestätigt werden, dass die aktivierte Form von NF-κB/p65 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisbar war. Das Vorhandensein der aktivierten Form hängt von dem jeweiligen Hautstadium ab. Während die aktivierte Form verstärkt im kranken Hautgewebe vorlag, konnte sie auch teils im gesunden Hautgewebe nachgewiesen werden.

3.4.5 Färbungen mit Antikörper IKK α/β (H-470): sc-7607

Eine weitere Frage stellten wir uns, welche Funktion denn IKK α/β bei Vorhandensein oder Fehlen von NF-κB/p65 hat. Der IKK α/β -Komplex ist im Zytoplasma lokalisiert und kann in nicht aktivierter und aktivierter Form vorliegen. Um die Verteilung der inaktivierten Form in der Haut von *RelA*^{k5Δ/k5Δ} und Wildtypmäusen zu untersuchen, haben wir den Antikörper IKK α/β (H-470) verwendet.

In Abbildung 3.74 und Abbildung 3.75 sieht man mehrere histochemische Ausschnitte von Tumorgewebe der Mauslinie *RelA*^{k5Δ/k5Δ}. Deutlich erkennbar ist bei allen

vier links dargestellten Abbildungen die durchgängige zytoplasmatische Färbung. Werfen wir einen Blick auf die in Abbildung 3.74 dargestellten Hautabschnitte, so sieht man eine ausgeprägte epidermale Hyperplasie. Den histomorphologischen Unterschied zwischen krankem und gesundem Hautgewebe zeigt das untere Bild in Abbildung 3.74. Die Epidermis des Tumorgewebes ist im Gegensatz zur normalen, gesunden Haut stark verbreitert. Im Färbeverhalten unterscheiden sich in diesem Fall krankes und gesundes Hautgewebe nicht. In Abbildung 3.75, oben links, ist eine ausgeprägte Hyperplasie mit durchgängigen zytoplasmatischen Färbeverhalten zu erkennen. Dagegen ist in dem links angeordneten unteren Foto, Abbildung 3.75, das Zytoplasma des tumorartigen Gewebes stark gefärbt und die Färbung der normalen, gesunden Haut fällt negativ aus.

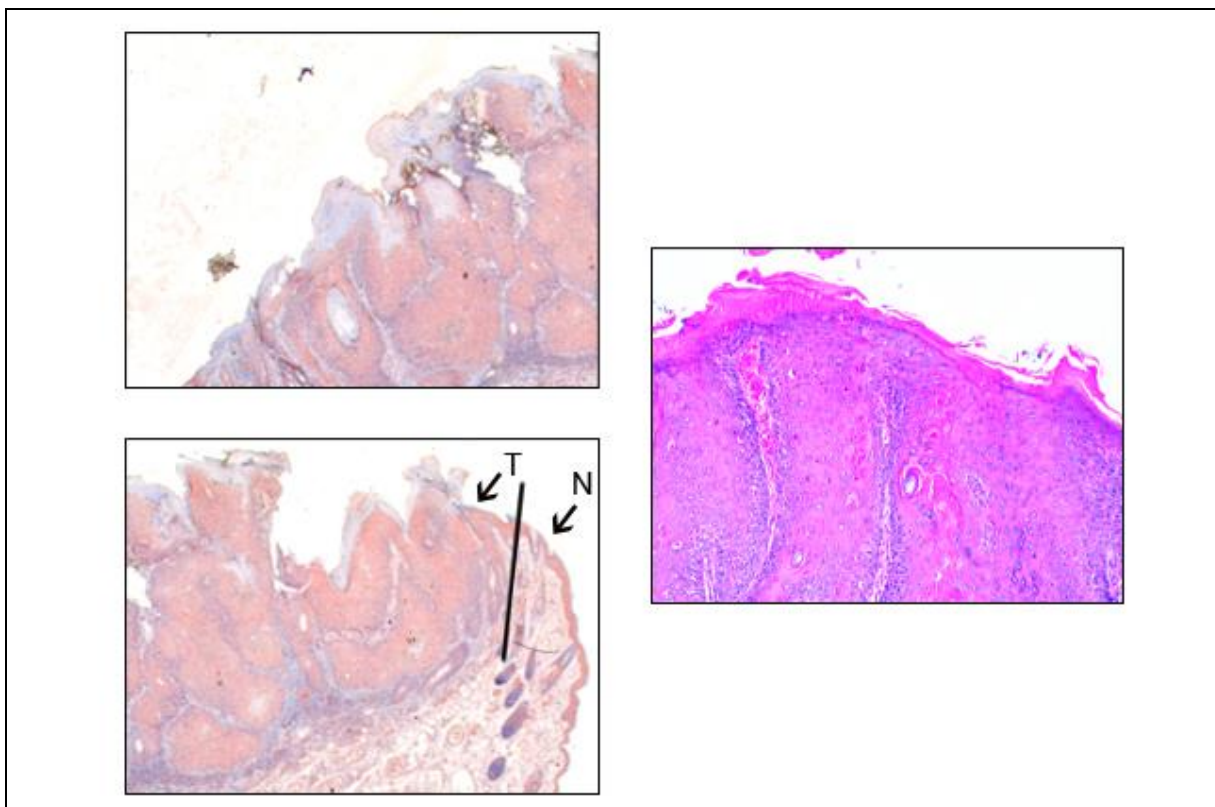


Abbildung 3.74: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase der beiden Gewebe

links oben: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:100, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor ausgeprägte epidermale Hyperplasie (Plattenepithelkarzinom), durchgängige zytoplasmatische Färbung

links unten: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:100, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor und normale, gesunde Haut

rechts: HE-Färbung

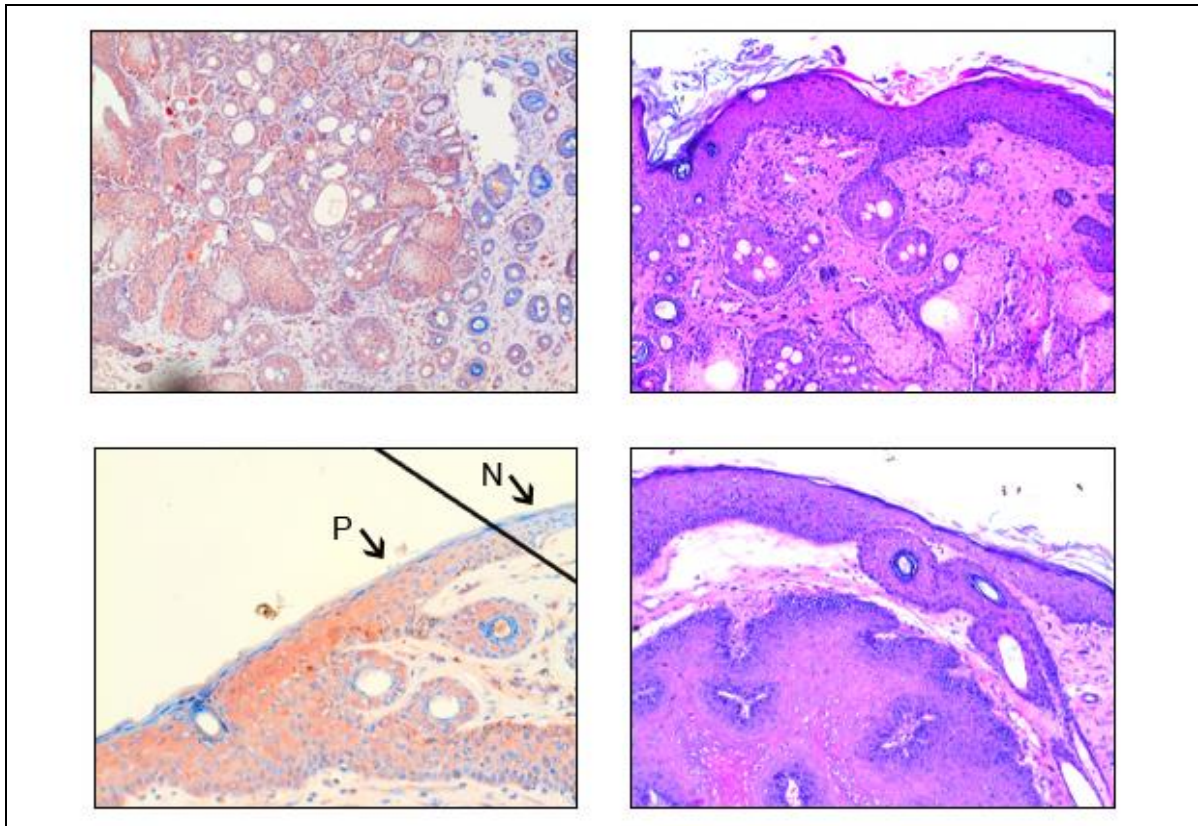


Abbildung 3.75: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: P: Papillom; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase zum gesunden Hautgewebe

links oben: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, Tumor ausgeprägte epidermale Hyperplasie, durchgängiges zytoplasmatisches Färbeverhalten

rechts oben: HE-Färbung

links unten: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, Papillom und gesunde, normale Haut

Detailaufnahme: Zytoplasmatische Anfärbbarkeit basaler, wie suprabasaler Keratinozyten, teilweise Anfärbbarkeit auch von Keratinozyten im Stratum granulosum

rechts unten: HE-Färbung

Zum Vergleich ziehen wir die Hautschnitte der Wildtypmäuse heran, Abbildung 3.76 und Abbildung 3.77. Krankes und gesundes Hautgewebe zeigen zunächst gleiches zytoplasmatisches Färbeverhalten. Dies ist auf dem Bild links oben, Abbildung 3.76, deutlich zu erkennen. Betrachtet man jedoch den Hautschnitt genauer, detaillierte Darstellung siehe Abbildung 3.77 oben, so ist die teils negative Färbung von normaler Haut (Bild links unten) im Vergleich zum Tumorgewebe und zu anderen normalen Hautabschnitten auffällig. Es zeigt sich hier die Übergangszone von normaler Epidermis hin zum Plattenepithelkarzinom. Dabei sind verschiedene Stadien der normalen Haut vorzufinden, wo in einem IKK α/β in nicht-phosphorylierter Form vorliegt, siehe Abbildung 3.76 oben links.

Das linke mittlere Bild in Abbildung 3.76 zeigt eine epidermale Hyperplasie (Plattenepithelkarzinom) und zytoplasmatische Anfärbbarkeit suprabasaler Keratinozyten. Dagegen sind die basalen Keratinozyten weitgehend negativ.

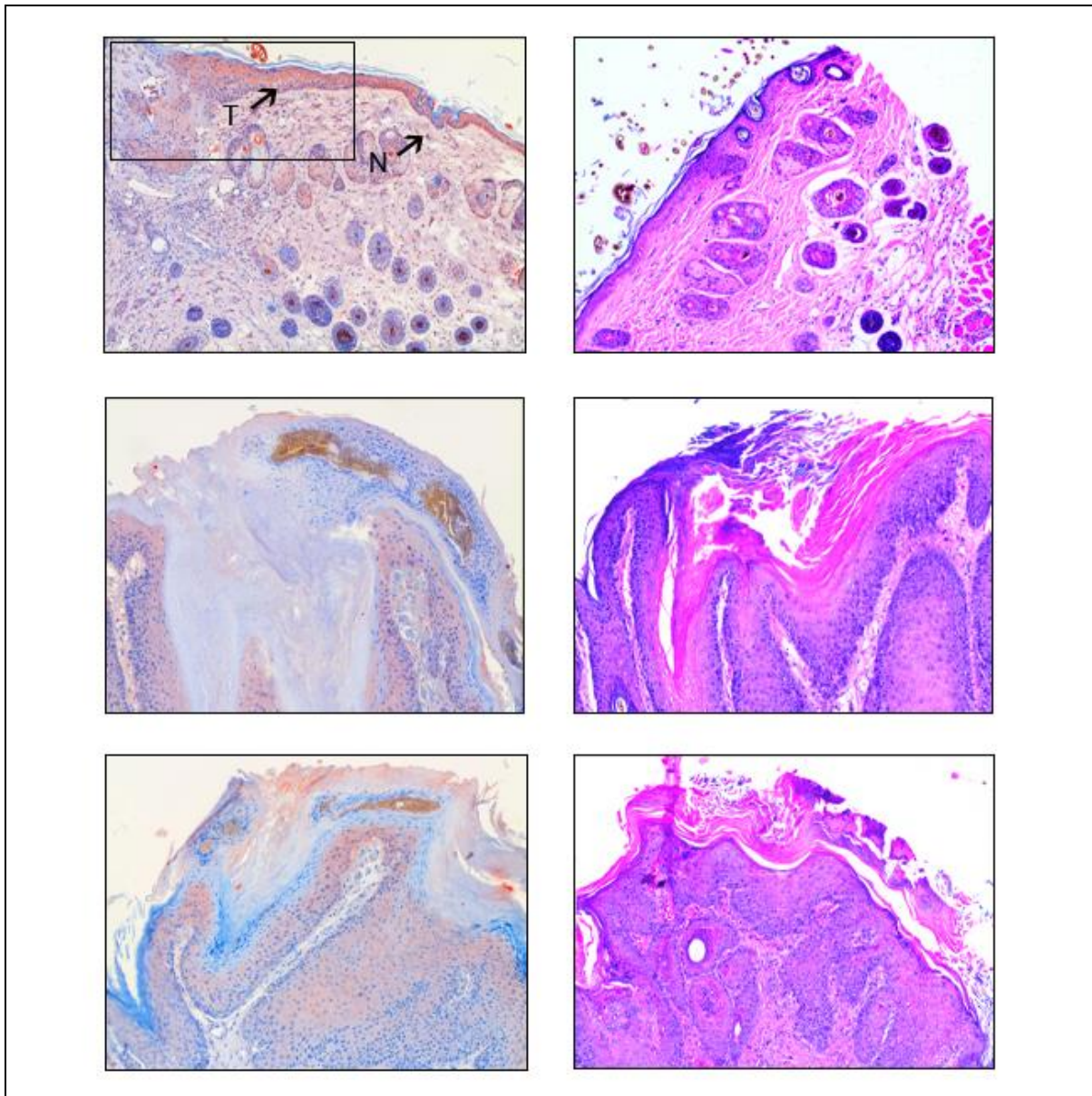


Abbildung 3.76: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; umrahmter Abschnitt wird in der unteren Abbildung vergrößert gezeigt

links oben: Färbung mit IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, Tumor und normale Haut

Durchgängige epidermale Anfärbbarkeit der Keratinozyten, zytoplasmatisch

rechts oben: HE-Färbung

links mittig: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, Tumor, Epidermale Hyperplasie (Plattenepithelkarzinom), zytoplasmatische Anfärbbarkeit suprabasaler Keratinozyten. Basale Keratinozyten weitgehend negativ.

rechts mittig: HE-Färbung

links unten: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, Tumor

rechts unten: HE-Färbung

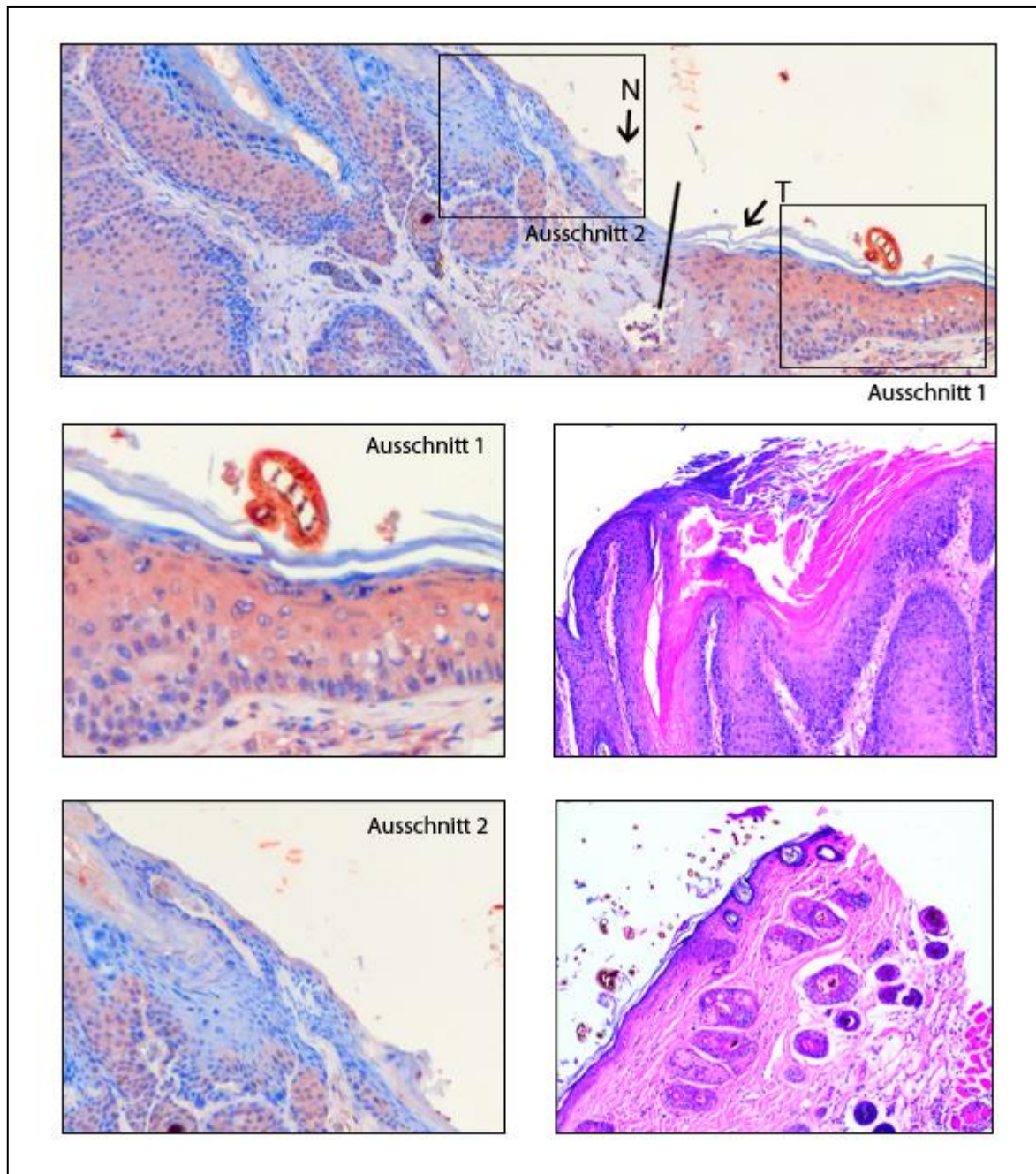


Abbildung 3.77: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe

oben: Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, Tumor und normale Haut

links mittig (Ausschnitt von oben): Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, Tumor

rechts mittig: HE-Färbung

links unten (Ausschnitt von oben): Färbung mit AK IKK α/β (H-470): sc-7607, 1:200, C57BL/6, normale Haut

rechts unten: HE-Färbung

Übergangszone: Normale Epidermis hin zu einem Plattenepithelkarzinom. Zunehmende zytoplasmatische Anfärbung der Keratinozyten.

3.4.6 Färbungen mit Antikörper Phospho-IKK α/β (Ser176/180)

Um das Verhalten der aktivierten Form von IKK α/β zu untersuchen, haben wir den oben genannten Antikörper ausgewählt, der Phospho-IKK α detektiert, wenn eine Phosphorylierung an Serin 176/180, und IKK β , wenn eine Phosphorylierung an Serin 176/180 stattgefunden hat. Die aktivierte Form der IKK α/β ist ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert. Auf den ersten Blick fällt in Abbildung 3.78 auf, dass die Epidermis der Knockout-Maus (*RelA*^{k5 Δ /k5 Δ}) intensiver gefärbt ist als bei der Wildtypmaus. Betrachtet man den histochemischen Schnitt von *RelA*^{k5 Δ /k5 Δ} , links oben, genauer, so zeigt das Stratum corneum eine negative Färbung, während die basalen Keratinozyten diskret positiv sind. Der histochemische Schnitt der Wildtypmaus, unteres Bild (Abbildung 3.78), überwiegt mit einer epidermalen Hyperplasie. Am oberen rechten Bildrand sind die Tumorzellen leicht angefärbt, während der Rest der Tumorzellen weitgehend negativ gefärbt ist.

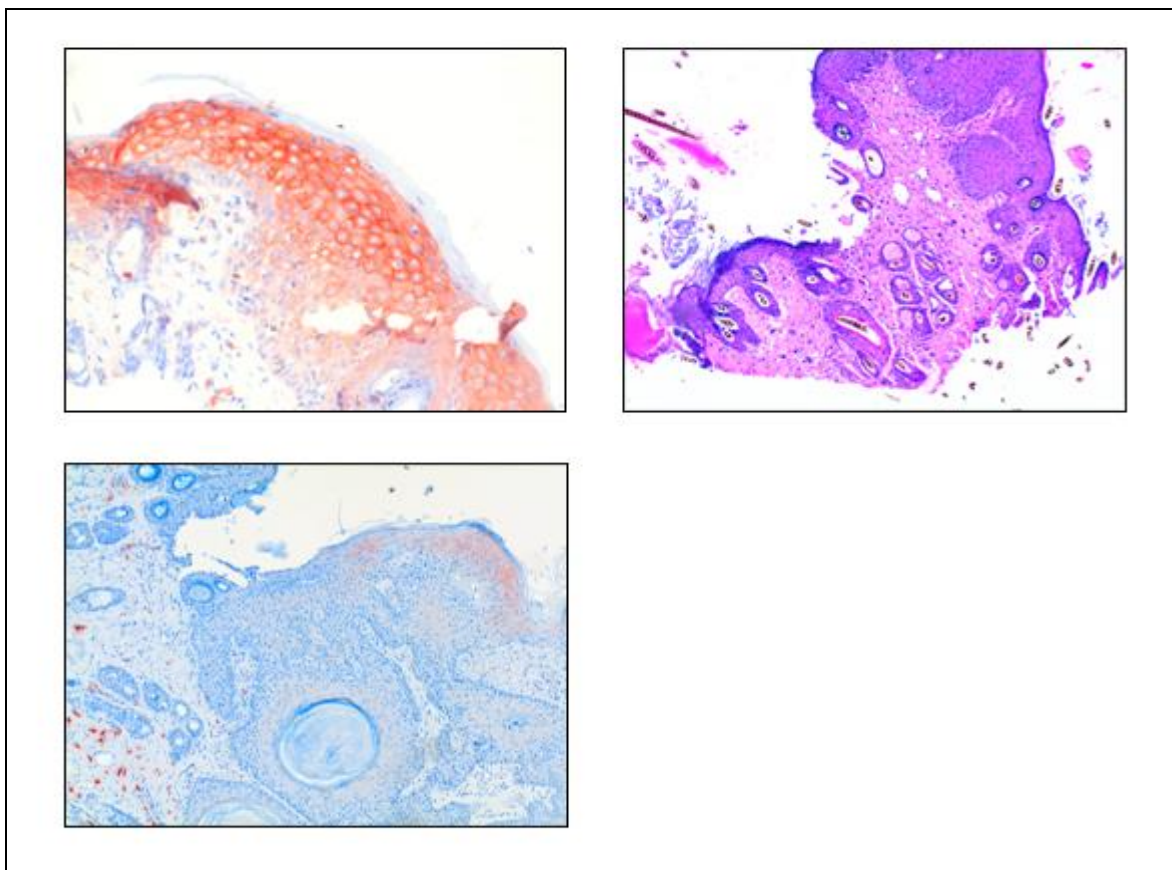


Abbildung 3.78: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

links oben: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, *RelA*^{k5 Δ /k5 Δ} , Tumor

Detailaufnahme durchgängiger zytoplasmatischer Anfärbbarkeit. Basale Keratinozyten diskret positiv. Stratum corneum negativ. Fehlendes Stratum granulosum.

rechts oben: HE-Färbung zu links oben

links unten: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, C57BL/6, Tumor

Epidermale Hyperplasie (Plattenepithelkarzinom). Tumorzellen weitgehend negativ.

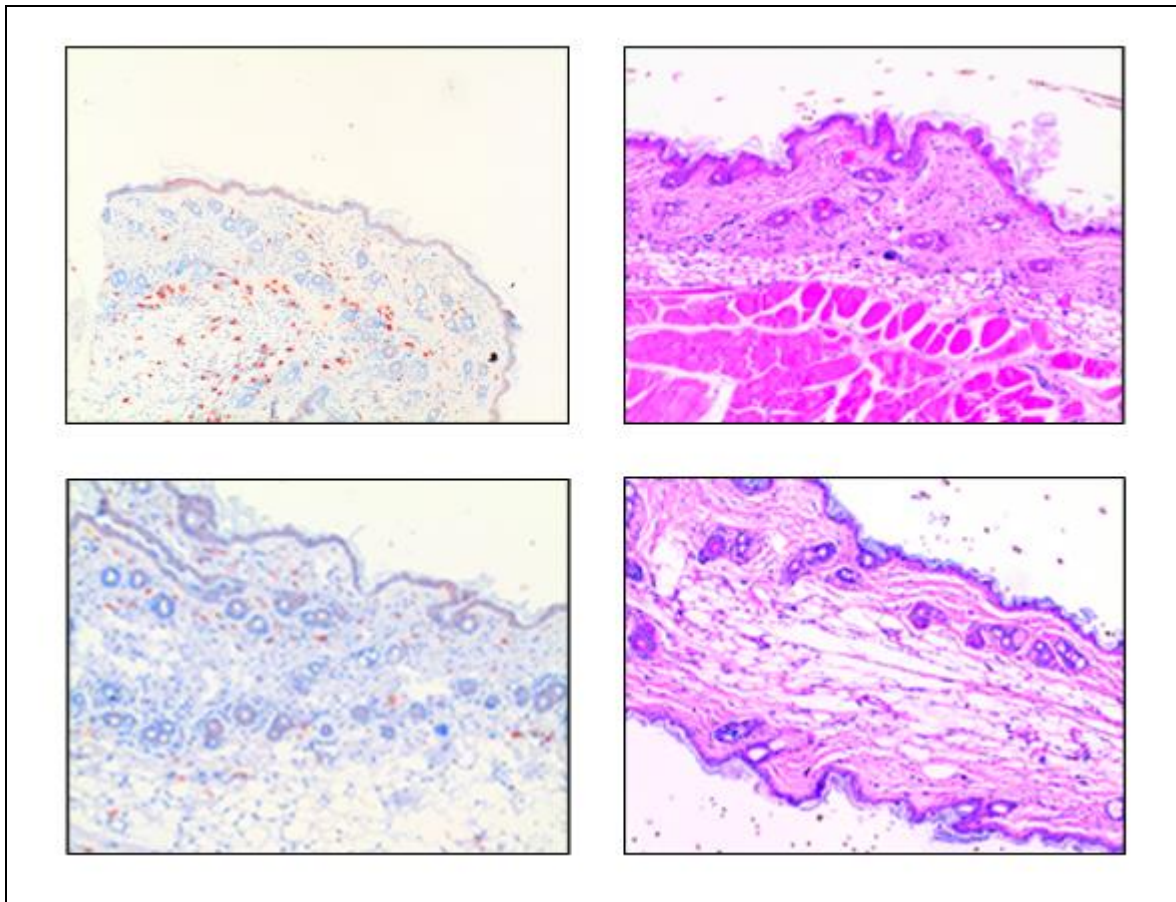


Abbildung 3.79: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung
 links oben: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, *ReIA^{k5Δ/k5Δ}*, normale Haut
 rechts oben: HE-Färbung zu links oben
 links unten: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, C57BL/6, normale Haut
 rechts unten: HE-Färbung zu links unten

Abbildung 3.79 zeigt normale, gesunde Haut, detektiert mit Antikörper Phospho-IKK α/β , von einer Knockout- und einer Wildtyp-Maus. Hier kann man ebenfalls beobachten, dass die Epidermis bei der transgenen Maus intensiver gefärbt ist, als bei der Wildtypmaus.

Die histochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die aktivierte und inaktivierte Form von IKK α/β in Abhängigkeit des jeweiligen Hautstadiums im Zytoplasma der Hautzellen vorlag. Anhand der intensiveren Färbungen der Haurpartien konnte auf eine höhere Konzentration an IKK α/β in den Hautzellen der transgenen Mäuse geschlossen werden.

3.4.6.1 Vergleich immunhistochemischer Färbungen mit Antikörper

Phospho-IKK α/β (Ser176/180) und Phospho-NF- κ B-p65 (Ser276)

Eine Gegenüberstellung der immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern Phospho-IKK α/β (Ser176/180) und Phospho-NF- κ B p65 (Ser276) sowohl von Tumorgewebe, als auch von normaler, gesunder Haut beider Mauslinien soll noch mal eine Übersicht darüber geben, wann IKK α/β und RelA in den verschiedenen Hautstadien nachweisbar sind.

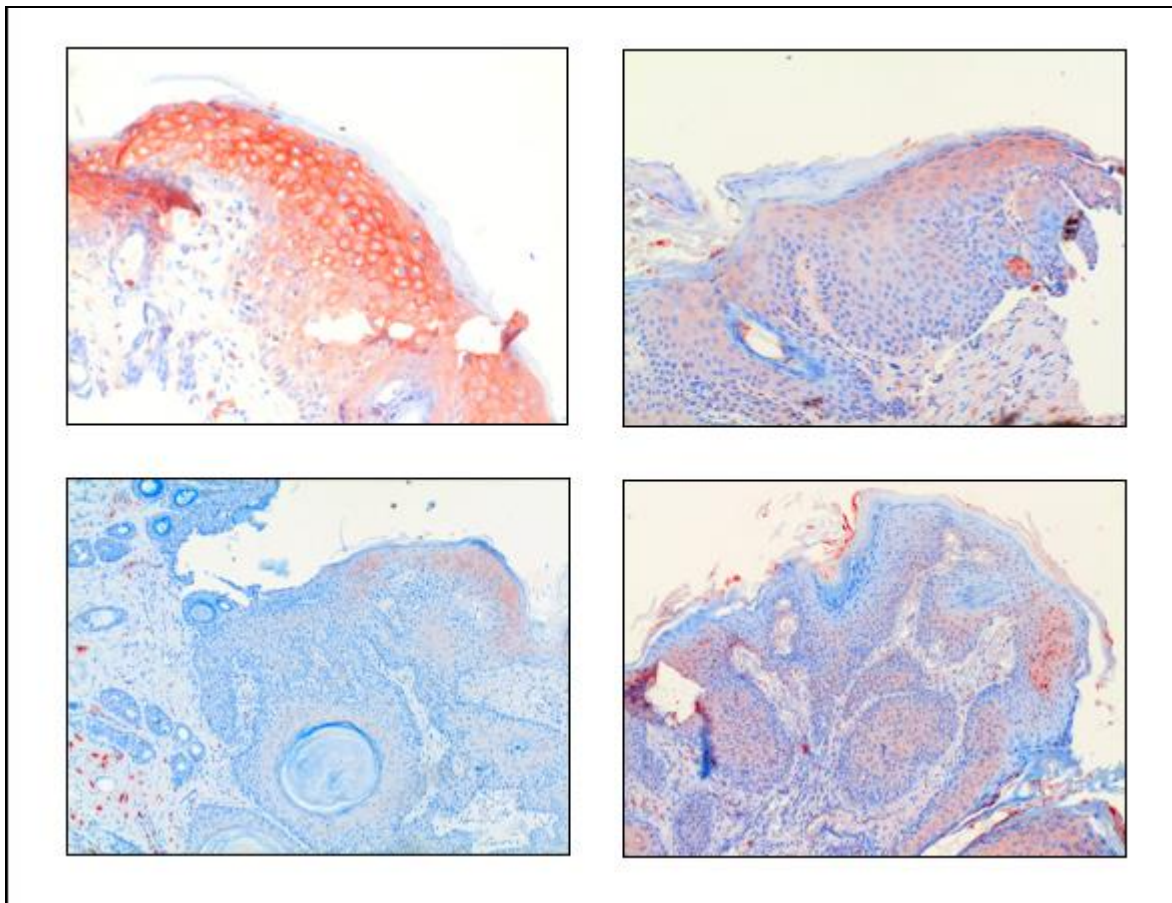


Abbildung 3.80: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

links oben: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, *RelA*^{k5 Δ /k5 Δ} , Tumor

recht oben: Färbung mit AK p- NF- κ B p65 (Ser276), 1:25, *RelA*^{k5 Δ /k5 Δ} , Tumor

links unten: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, C57BL/6, Tumor

rechts unten: Färbung mit AK p- NF- κ B p65 (Ser276), 1:25, C57BL/6, Tumor

In Abbildung 3.80 wird Tumorgewebe von beiden Mauslinien dargestellt. Die beiden oberen Bilder zeigen, dass bei den transgenen Mäusen in bestimmten Tumorstadien eine hohe Konzentration an Phospho-IKK α/β in der Epidermis vorliegt, siehe linkes, oberes Bild (erkennbar an der intensiven Färbung der Epidermis), wenn RelA nicht in der Epidermis aufgrund von Deletion vorhanden ist, (siehe rechtes, oberes Bild -

negatives Färbeverhalten der Epidermis). Im Vergleich zu den Wildtypmäusen (siehe untere Bilder in Abbildung 3.80) fällt die Färbung der Epidermis mit dem Antikörper Phospho-IKK α/β (Ser176/180) (Bild links unten) nicht so intensiv aus, wenn RelA in der Epidermis phosphoryliert vorliegt, (siehe Bild rechts unten).

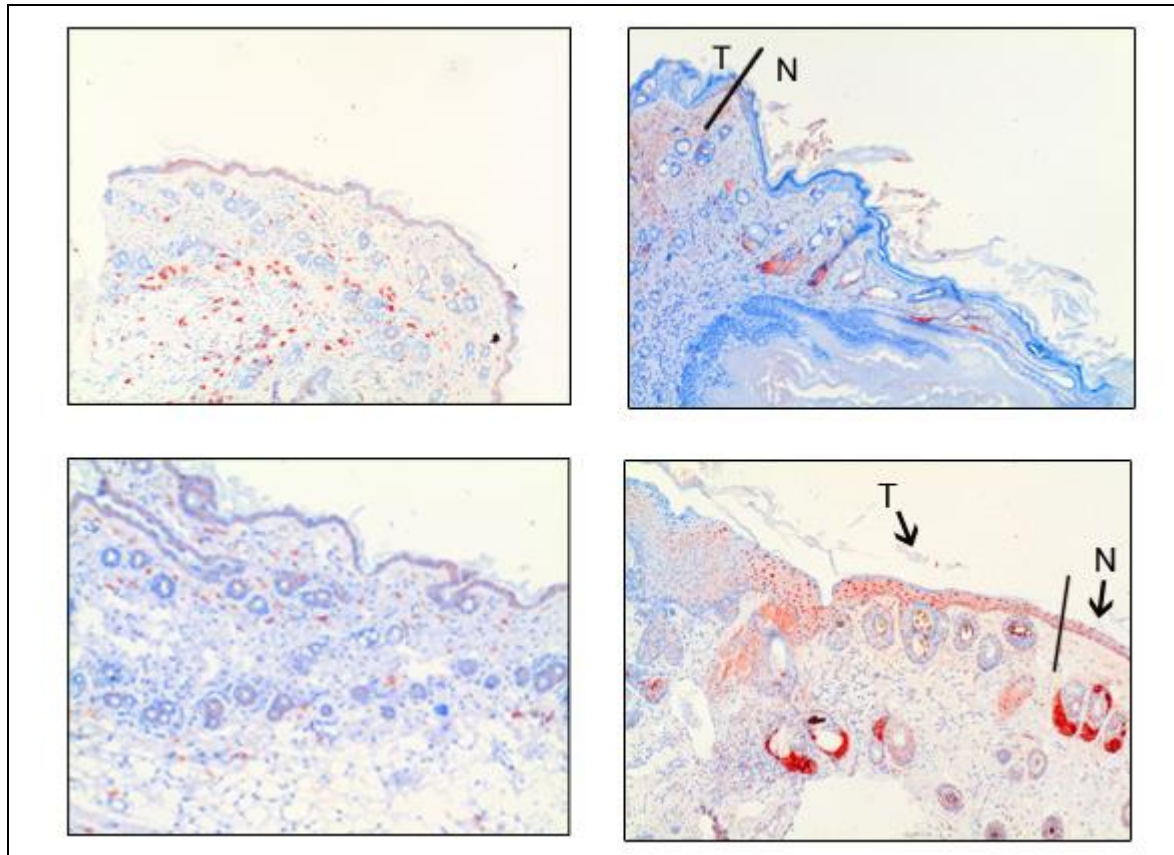


Abbildung 3.81: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase der beiden Gewebe

links oben: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, normale Haut

rechts oben: Färbung mit AK p- NF- κ B p65 (Ser276), 1:25, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumorgewebe und normale Haut

links unten: Färbung mit AK Phospho-IKK α/β (Ser176/180), 1:5, C57BL/6, normale Haut

rechts unten: p- NF- κ B p65 (Ser276), 1:25, C57BL/6, Tumor und normale Haut

Ein ähnliches Färbeverhalten kann man auch bei gesundem Hautgewebe beobachten. Wirft man einen Blick auf die linken Bilder in Abbildung 3.81, wo die immunhistochemische Färbung mit Antikörper Phospho-IKK α/β (Ser176/180) durchgeführt wurde, dann ist die Epidermis bei der transgenen Maus, linkes oberes Bild, stärker angefärbt als bei der Wildtypmaus, siehe Bild links unten. Liegt RelA in seiner phosphorylierten Form in der Epidermis vor, siehe rechtes Bild unten in Abbildung 3.81, dann kann eine geringere Konzentration an phosphorylierten IKK α/β nachgewiesen werden.

3.4.7 Färbungen mit Antikörper c-Jun (H-79): sc-1694

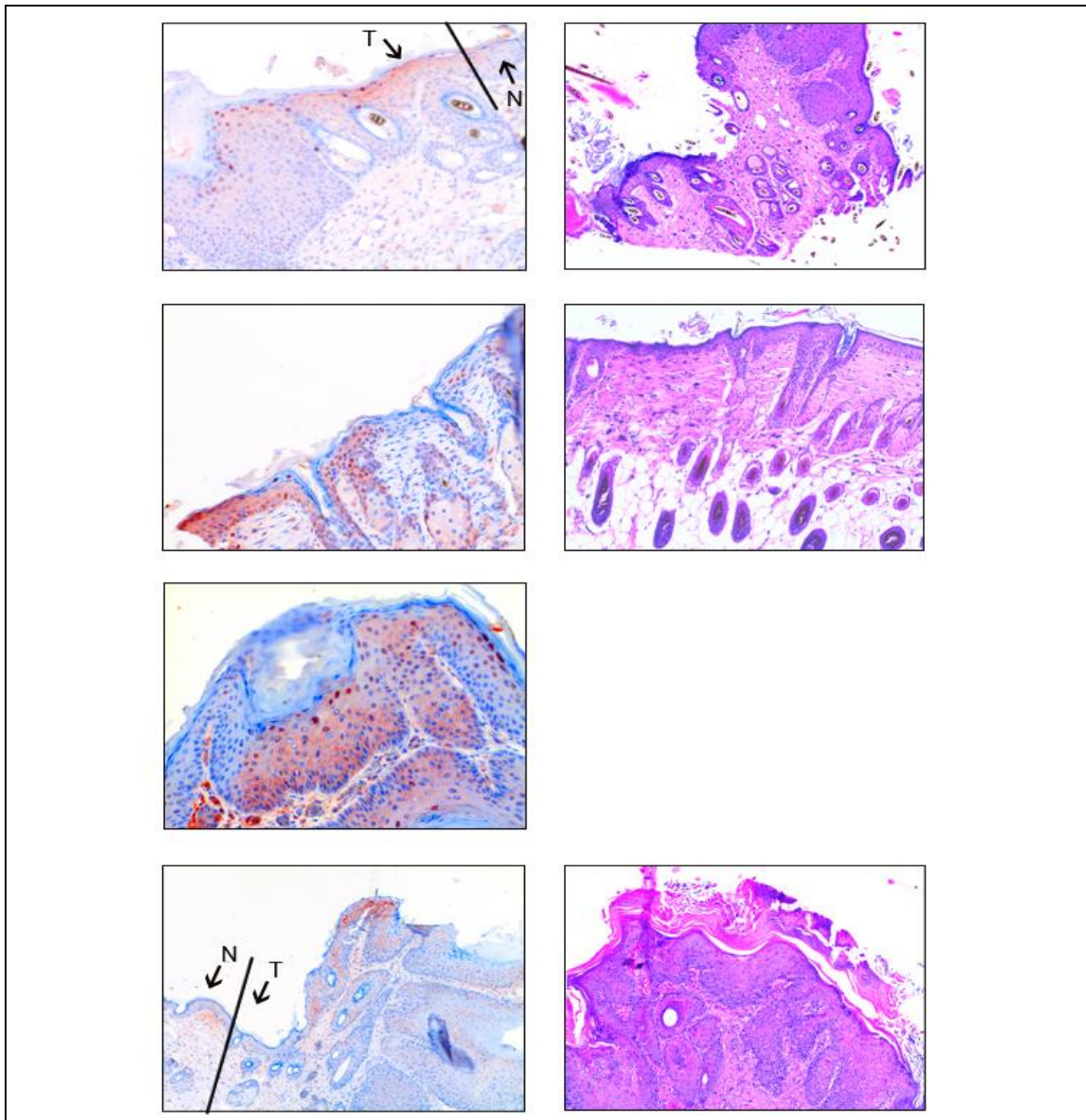


Abbildung 3.82: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase der beiden Gewebe

links oben: Färbung mit AK c-Jun (H-79): sc-1694, 1:300, *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, Tumor und normale, gesunde Haut; Positives Färbeverhalten der Zellkerne des Stratum granulosums. Unspezifische Färbung des Zytoplasmas.

rechts oben: HE-Färbung

links mittig oben: Färbung mit AK c-Jun (H-79): sc-1694, 1:300, *RelA^{k5Δ/k5Δ}*, Tumor; Nukleare Anfärbbarkeit basaler und suprabasaler Zellkerne. Unspezifische Färbung des Zytoplasmas.

rechts mittig oben: HE-Färbung

links mittig unten: Färbung mit AK c-Jun (H-79): sc-1694, 1:300, C57BL/6, Tumor
Zellkerne des oberen Stratum spinosums, bzw. Stratum granulosums positiv.
Unspezifische Färbung des Zytoplasmas.

links unten: c-Jun (H-79): sc-1694, 1:300, C57BL/6, Tumor und normale Haut
Übergangsbereich normale Haut zu epidermalen Tumor (Plattenepithelkarzinom)

rechts unten: HE-Färbung

Zusätzlich bezogen auf $IKK\alpha/\beta$ waren wir an dem Verhalten der Komponente c-Jun (in inaktivierter und aktivierter Form) bei Vorhandensein und Fehlen von NF- κ B/p65 interessiert, was mit Hilfe histochemischer Färbungen ebenfalls gut nachweisbar ist. Als Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1 ist c-Jun im Zellkern lokalisiert. Das Verdünnungsverhältnis 1:300 des Antikörpers c-Jun (H-79) lieferte uns aussagekräftige Bilder, wie in Abbildung 3.82 zu sehen ist. In der Abbildung oben links sind die Zellkerne im Stratum granulosum positiv angefärbt. Der direkt neben dem Tumorgewebe befindliche gesunde Hautabschnitt zeigt keine Färbung der Zellkerne. Ein weiteres Färbeverhalten kann man im zweiten Hautabschnitt, links mittig oben, der transgenen Maus (*RelA^{k5Δ/k5Δ}*) beobachten. Hier sind die Zellkerne auf basaler und suprabasaler Ebene angefärbt. Zum Vergleich schauen wir auf die zwei unteren Bilder, die Hautabschnitte von Wildtypmäusen zeigen. In der Abbildung links mittig unten erkennt man die intensive Färbung der Zellkerne im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum des Tumorgewebes, aber es ist auch ein abrupter Übergang zum negativen Färbeverhalten in morphologisch unauffällige epidermale Anteile feststellbar. Die untere Abbildung zeigt den Übergangsbereich von normaler Haut zum epidermalen Tumor. Nur ein geringer Teil der Zellkerne ist im Tumorgewebe angefärbt, während die Färbung in der normalen Haut komplett negativ ausfällt. Abbildung 3.83 zeigt einen Hautabschnitt von einer Wildtypmaus, auf dessen Haut nur Azeton appliziert wurde. Hier ist die Färbung der Zellkerne negativ.

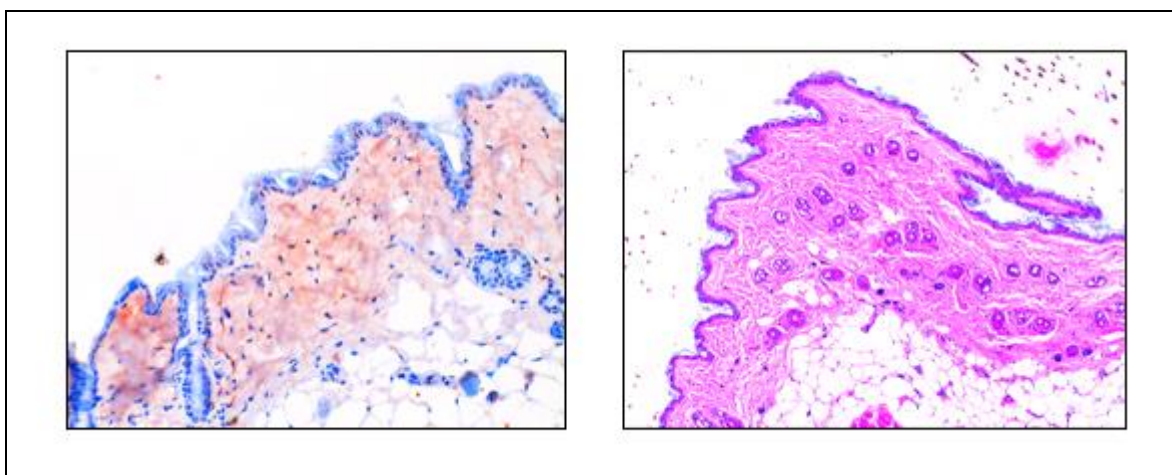


Abbildung 3.83: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

links: Färbung mit AK c-Jun (H-79): sc-1694, 1:300, C57BL/6, normale Haut (Reagens: Azeton)

Färbung der Zellkerne in Epidermis negativ. Unspezifische Färbung des Zytoplasmas.

rechts: HE-Färbung

3.4.8 Färbungen mit Antikörper Phospho-c-Jun (Ser73)

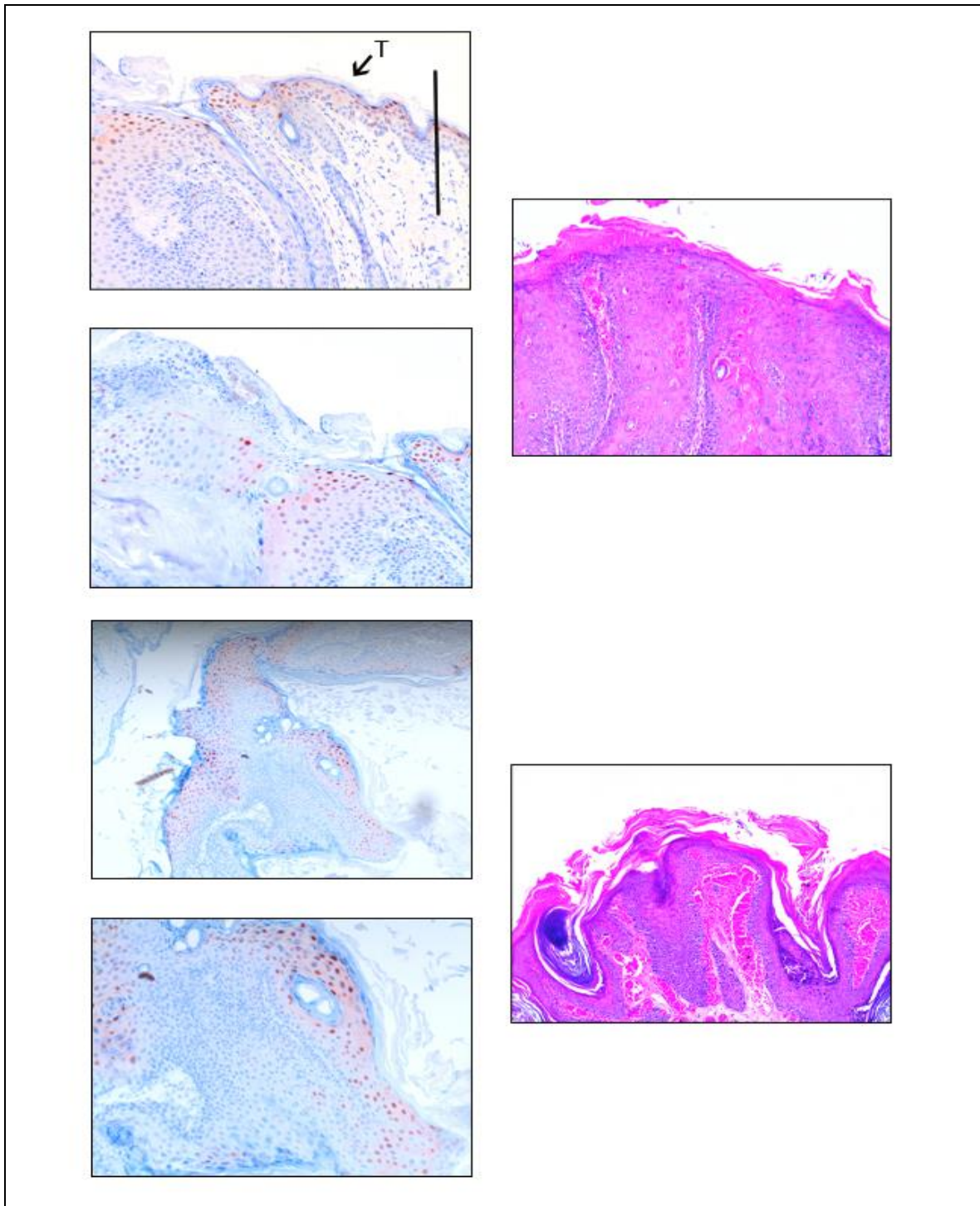


Abbildung 3.84: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung

Legende: T: Tumorgewebe; N: normales gesundes Hautgewebe; schwarze Linie: Übergangsphase von Tumorgewebe und gesundem Hautgewebe

links oben: Färbung mit AK Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, RelAk5Δ/k5Δ, Tumor
Kernfärbung von Keratinozyten im Stratum spinosum.

links mittig oben: Färbung mit AK Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, RelAk5Δ/k5Δ, Tumor

rechts mittig oben: HE-Färbung

links mittig unten: Färbung mit AK Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, C57BL/6, Tumor

links unten (Ausschnitt von oben): Färbung mit AK Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, C57BL/6, Tumor

rechts mittig unten: HE-Färbung

Das phosphorylierte c-Jun ist ebenfalls nur im Zellkern zu finden. Der Antikörper Phospho-c-Jun (Ser73) detektiert die aktivierte Form von c-Jun nur, wenn an Serin73 eine Phosphorylierung stattgefunden hat.

Auf den Abbildung 3.84 und Abbildung 3.85 kann man sehen, dass die Zellkerne im Tumorgewebe von beiden Mauslinien angefärbt sind.

c-Jun ist in seiner aktivierten Form in den Zellkernen des Tumorgewebes, erkennbar an dem verbreiterten Epidermisband, in hoher Konzentration vorzufinden.

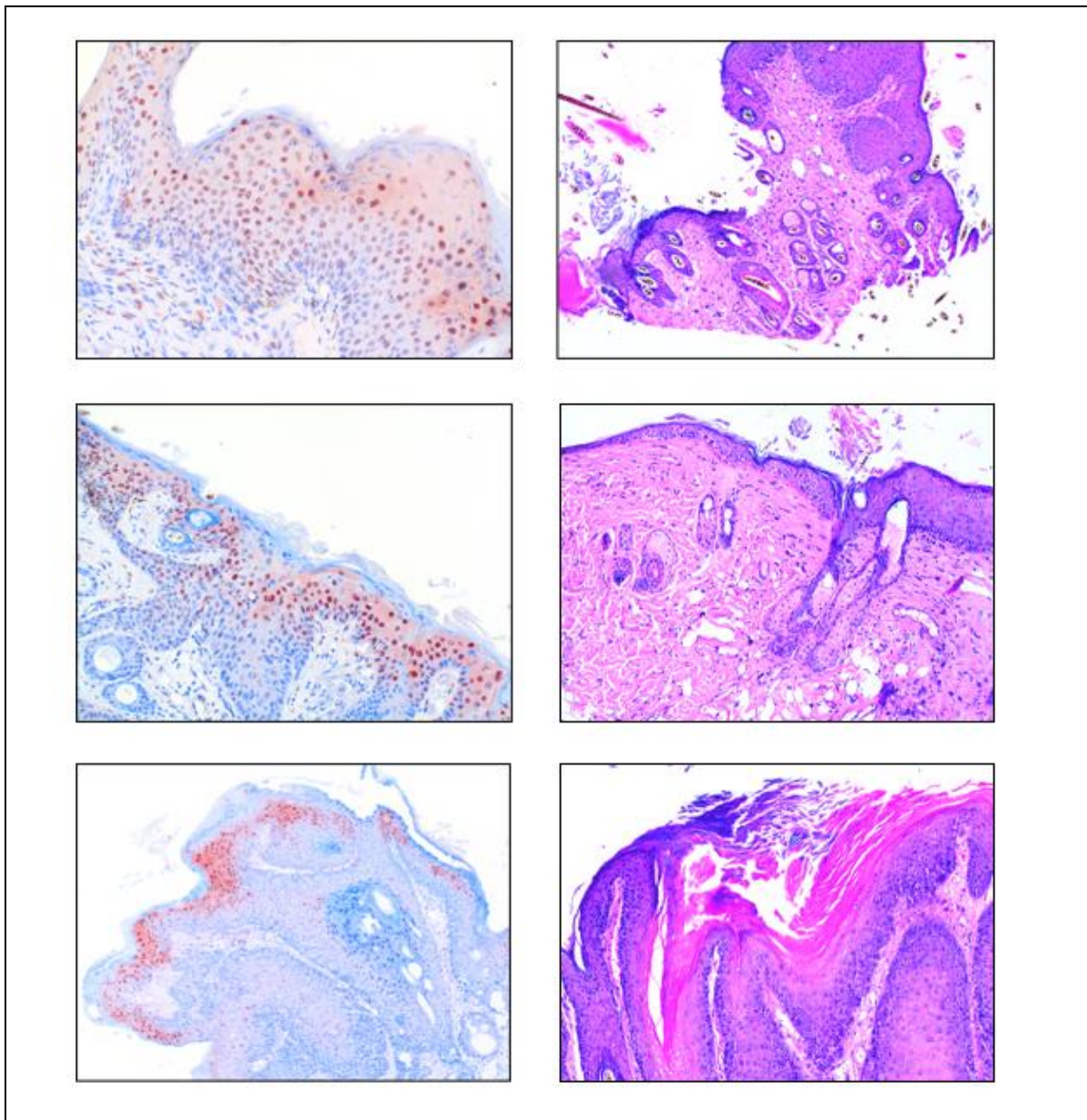


Abbildung 3.85: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung
 links oben: Färbung mit Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor
 rechts oben: HE-Färbung
 links mittig: Färbung mit Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, Tumor
 rechts Mitte: HE-Färbung
 links unten: Färbung mit Phospho-c-Jun (Ser73), 1:10, C57BL/6, Tumor
 rechts unten: HE-Färbung

Die Detektion von c-jun hat gezeigt, dass die aktivierte Form verstärkt in den Zellkernen von Tumorzellen vorhanden war. Je nach Hautstadium war die inaktivierte Form im Zellkern von sowohl gesunden Hautzellen als auch von Tumorzellen nachweisbar.

3.4.9 Negativkontrolle

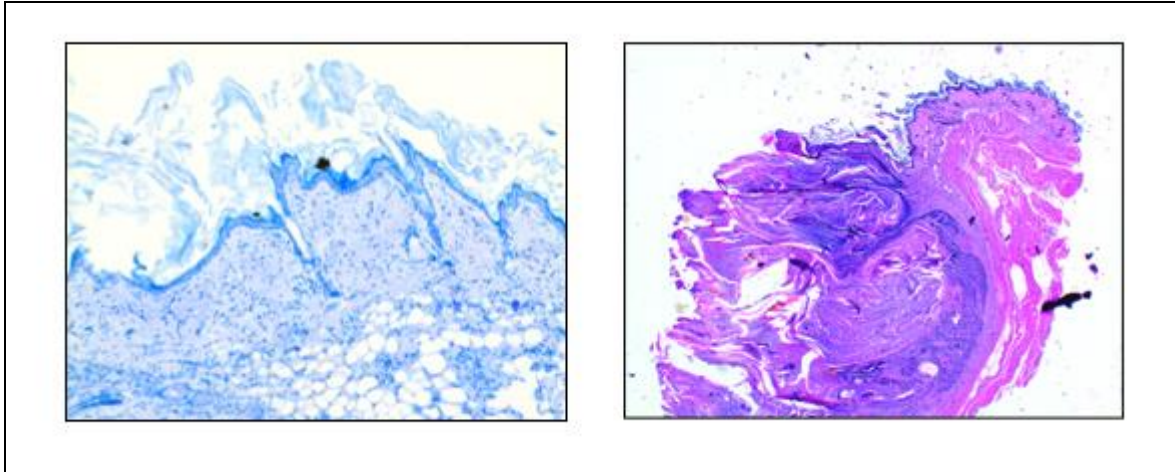


Abbildung 3.86: Immunhistochemische "Färbung" und HE-Färbung

links: Immunohistochemische Negativkontrolle, *RelA*^{k5Δ/k5Δ}, normale, gesunde Haut „Färbung“ mit PBS anstatt mit einem Antikörper

rechts: HE-Färbung

Die Negativkontrolle zeigt in Abbildung 3.86, wie zu erwarten, keine Färbung.

4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Genregulation von verschiedenen Zellprozessen. In seiner Funktion als zentraler Regulator der Immunantwort (Pahl und Baeuerle, 1997) hat er im Zusammenspiel mit anderen Mechanismen einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Entzündungsprozessen und auf die Karzinogenese, so dass seine Untersuchung auch weiterhin verstärkt im Blickpunkt der Forschung steht. Er ist u.a. für die epidermale Entwicklung und Differenzierung verantwortlich. Eine Fehlfunktion von NF- κ B beeinflusst die Physiologie und Pathologie der Haut und kann zum Beispiel zu Psoriasis, Autoimmunkrankheiten bis hin zu Hautkrebs führen, (Baldwin, 2001).

In dieser Arbeit galt es zu untersuchen, welche Auswirkungen die Deletion der Untereinheit RelA des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von spinozellulären Karzinomen der Haut hat.

4.1 Bedeutung von RelA bei der Entstehung von Hauttumoren

Durch die Induktion von Hauttumoren bei den zum Vergleich herangezogenen Mauslinien haben wir aufschlussreiche Beobachtungen gemacht. Einer der Ergebnisse unserer Untersuchungen war, dass die Tumorentwicklung bei den Mäusen mit deletiertem *RelA* tendenziell später einsetzte als bei Mäusen, bei denen dieses Gen vorhanden war (Abbildung 3.17). Vergleicht man zudem die Ergebnisse bei zweimaliger TPA-Applikation und dreimaliger TPA-Applikation/erhöhter TPA-Konzentration miteinander, so reduzierte sich beim Vergleich der beiden Mauslinien der Zeitabstand bzgl. der ersten Tumorentwicklung bzw. es kam sogar zu einer Angleichung (Abbildung 3.39). Hier kann zunächst die Vermutung geäußert werden, dass die Deletion von *RelA* einen zeitlichen Faktor für die Entstehung der Papillome darstellt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Tumorpromotor TPA auch eine entscheidende Rolle spielt. Im Prozess der Karzinogenese hat er die Funktion als Stimulator des Zellwachstums.

In unseren Versuchen wurde hierzu zum einen TPA zweimal und zum anderen dreimal wöchentlich auf die Haut appliziert. In Bezug auf Abbildung 3.17 und Abbildung 3.39 haben auch unsere Beobachtungen bestätigt, dass die Frequenz der Applikation von Tumorpromotoren einen Einfluss auf die Entstehung von Papillomen

nimmt (Van Duuren et al., 1973). Die dreimalige TPA-Applikation pro Woche löste die Erstentwicklung von Papillome zu einem noch früheren Zeitpunkt bei beiden Mauslinien aus als bei der zweimaligen Applikation pro Woche. Trotz der Frequenzerhöhung von TPA erfolgte die Entwicklung von Papeln bei den Wildtypmäusen zum Teil eher als bei den transgenen Mäusen. Diese Beobachtung unterstreicht die zellteilende und zelldifferenzierende Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B unter Mitwirkung von TPA. Bei der Untersuchung anderer Krebsarten, z.B. Lungenadenokarzinom, konnte ebenfalls festgestellt werden, dass RelA u.a. einen Einfluss auf die Entstehung von Lungenkrebs nimmt. Eine Hemmung von *RelA*, führt zu einer Tumorrogression bzw. zu einem verlangsamten Fortschreiten der Tumorentwicklung (Xue et al., 2011).

Im Hinblick auf die Papillomanzahl/Tumoranzahl haben unsere Beobachtungen gezeigt, dass die Wildtypmäuse deutlich mehr Papillome/Tumore entwickelten. Im Schnitt zählten wir auch mehr Papillome/Tumore pro Maus bei den Wildtypmäusen. Zudem beobachteten wir bei zweimaliger TPA-Applikation pro Woche, dass der Tumordurchmesser bei den Wildtypmäusen geringfügig größer war als bei den transgenen Mäusen. Diese Ergebnisse sind wiederum darauf zurückzuführen, dass RelA eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielt (Bell et al., 2002), die letztendlich zu einem unkontrollierten Tumorwachstum führen kann. Zusätzlich zu erwähnen ist der geringfügige Anstieg der Papillomanzahl bei beiden Mauslinien, der nach der Frequenzerhöhung von TPA zu beobachten war. Bereits in den ersten Wochen der dreimaligen TPA-Behandlung pro Woche waren in den Versuchsreihen mehr Tumore zu verzeichnen. Eine Erklärung für diese Beobachtungen könnte die Funktion von TPA als Stimulator des Zellwachstums sein, das mit einer Frequenzerhöhung verstärkt werden könnte. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei der dreimaligen Applikation auch die Konzentration der TPA-Lösung höher war. Bezugnehmend auf die Fragestellung, ob nur bei der Konzentrationserhöhung von TPA oder bei höherer Frequenz der TPA-Applikation die Papillomanzahl anstieg, bedarf es differenzierte Untersuchungen. Unsere Versuchsreihen haben gezeigt, dass das Auftragen von TPA in verkürzten Abständen und mit erhöhter Konzentration die Stimulation des Zellwachstums verstärkt. Ein weiterer Faktor für den zeitlichen Verlauf und die Anzahl der sich entwickelten Papillomen ist zudem der genetische Hintergrund der Mäuse. C57BL/6 zählt zu einem Hintergrund, der dazu neigt, besonders früh Tumore zu bilden.

Während nun die Wildtypmäuse Papillome zu einem früheren Zeitpunkt entwickelten und eine verhältnismäßig hohe Papillomanzahl vorwiesen, waren dagegen die transgenen Mäuse häufiger von starken Hautentzündungen betroffen. Es ist zu überlegen, inwieweit hier ein Zusammenhang mit einer späteren Entwicklung von Tumoren besteht. Und es stellt sich die Frage, wie sich alle diese Beobachtungen mit Hilfe der Signaltransduktionswege erklären lassen. Außerdem wird es interessant sein, herauszufinden, welche Vorgänge ablaufen, wenn das Gen *RelA* deletiert ist und wie groß hier der Einfluss von TPA ist. Betrachten wir zunächst die Funktion von TPA genauer. Es ist bekannt, dass TPA die Fähigkeit besitzt, teilweise die Funktion von DAG (Diacylglycerol) zu übernehmen. Im Gegensatz zu DAG kann TPA, aufgrund seiner langsameren Metabolisierung (Gumpert, 2000), die PKC schneller und langanhaltender aktivieren. Über mehrere Phosphorylierungsschritte kommt es dann zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Der Grundstein für Entzündungsreaktionen und die Aktivierung der NF- κ B Kaskade ist gelegt. Sauerstoffradikale verursachen Gewebeschädigungen. Jetzt kommen die Makrophagen, welche zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören, zum Einsatz, die die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 freisetzen. TNF α aktiviert den NF- κ B Signaltransduktionsweg durch Bindung an den TNF-Rezeptor 2. Zur Auswertung der von uns gemachten Beobachtungen im Hinblick auf die Verwendung von TPA und die Deletion von *RelA* zogen wir das Karzinogenesemodell des Dickdarms zum Vergleich heran.

Haut und Dickdarm weisen Ähnlichkeiten in ihrem Aufbau auf. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die äußersten Schichten beider Organe aus Epithelzellen bestehen. Während die Haut ein mehrschichtiges Epithel besitzt, ist das des Dickdarms nur einschichtig. Bevor die Auswirkungen auf die Tumorentstehung bei Fehlen des Gens *RelA* in der Epidermis der Haut und im Dickdarm getestet werden konnten, wurden zunächst Tumore bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen induziert. DMBA, als Tumorinitiator, löst eine Punktmutation im H-Ras Gen aus. Ras-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellprozesses, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Ist das Ras-Gen aufgrund der Mutation dauerhaft aktiviert, führt dies zu permanenten wachstumsstimulierenden Signalen der Zelle. Zur Aktivierung von Ras (Ebinu et al., 1998 und Lorenzo et al., 2000) bindet der Tumorpromotor TPA an RasGRP1, einem zusätzlichen DAG/Phorbol-esterrezeptor in den epidermalen Keratinozyten (Rambaratsing et al., 2003).

Dagegen führt die Tumorinitiation mit Azoxymethan (AOM) zu einer homozygoten Deletion des Tumorsuppressors APC (adenomatous polyposis coli) im Dickdarm (Marks und Fürstenberger, 2000). Eine Voraussetzung für die Tumorentstehung ist gelegt. Die zusätzliche Gabe des Reizmittels Dextran-sulfat Sodium (DSS) (Suzuki et al., 2004) verursacht und verstärkt akute Entzündungsprozesse. Es kommt zur Schädigung des Epithels (Vekatraman et al., 2000) und zur Entstehung von Kryptenabszessen mit der Folge, dass auch im Darm die Makrophagen proinflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ freisetzen. Die dauerhafte Aktivierung von NF- κ B über $\text{TNF}\alpha$ in den Epithelzellen und in den Myeloidzellen des Darmes führt zur Entwicklung von entzündungsassoziiertem Krebs (Greten et al., 2004).

In unseren Versuchen konnten wir beobachten, dass die Entzündungsprozesse bei den transgenen Mäusen ($\text{RelA}^{\text{k5}\Delta/\text{k5}\Delta}$), bei denen *RelA* in der Epidermis deletiert wurde, ausgeprägter waren. Bei beiden Mauslinien ist unter anderen, die über TPA aktivierte Neusynthese und Hydrolyse von Phosphatidylcholin für die klassischen Entzündungssymptome verantwortlich, da es hier über die Freisetzung von Arachidonsäure und der Aktivierung von COX zur Entstehung von Prostaglandinen sowohl in der Haut als auch im Darm kommt. Prostaglandine stimulieren die Zellteilung und sind als Tumorpromotor auch in der Karzinogenese involviert. Die somit über Wochen hinweg regelmäßige Gabe von TPA triggert die Sezernierung von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen, so dass die Entzündung einen Dauerzustand darstellt und Hyperproliferation vermehrt festgestellt werden kann. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt hier eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsregulation. Er kontrolliert die Expression von Entzündungsmediatoren und trägt zur Steuerung des Heilungsprozesses bei, indem er die Migration von Keratinozyten an den Wundrand veranlasst. Die zusätzlich über die Raf1/MEK/MAPK Kaskade freigesetzten Wachstumsfaktoren unterstützen den Wundheilungsprozess. Die Beobachtungen bei den Wildtypmäusen haben gezeigt, dass NF- κ B auch für die Regeneration des epidermalen Gewebes von essentieller Bedeutung sind. Fehlt *RelA*, so ist der Wundprozess gehemmt. Es kommt zum einen zu einer erhöhten Teilungsrate und zum anderen zur verstärkten von TPA induzierten Apoptose. Apoptose verursacht wiederum Schäden in der Epithelschicht, die Ursachen für neue Entzündungsprozesse sein können. Zusätzlich trägt die hohe Konzentration an ROS zu dem Dauerzustand Entzündung bei, da die durch NF- κ B veranlasste Expression von Genen für Antioxidantien ausbleibt. Wir vermuten, dass es aufgrund der Deletion

von *RelA* zusätzlich zur Aktivierung anderer Signaltransduktionswege kommt (Bell et al. 2002, Pandolfi et al., 1993). Zum Beispiel kann es zu unterschiedlichen Paarbildungen von NF- κ B Untereinheiten kommen, die ebenfalls Inflamationsantworten auslösen können. Zu erwähnen wäre zum Beispiel der p105 Signaltransduktionsweg mit den Untereinheiten p50/p50 oder p50/c-rel. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Dickdarm gemacht werden. Neben der langanhaltenden Behandlung mit DSS, die zu einer erhöhten Zytokinproduktion und akuten Colitis führt, kommt es durch Blockieren des klassischen NF- κ B-Signaltransduktionsweges aufgrund der Deletion von *RelA* zur zytokininduzierten Apoptose (Gitter et al., 2000). Der Verlust einzelner intestinaler Epithelzellen verursacht Defekte in der Barrierschicht, die den Eintritt von Antigenen ermöglichen. Zudem bleibt die von NF- κ B gesteuerte Expression von antimikrobiellen Genen aus. Der Herd für akute Entzündungen und später für chronische entzündliche Darmerkrankungen ist gelegt. Ebenfalls konnte eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität von c-Rel und p50 nachgewiesen werden, die durch Genexpression zusätzlich proinflammatorische Zytokine beisteuern. Im Vergleich zu den Keratinozyten führt auch in den Epithelzellen des Dickdarms der Verlust von *RelA* zur Unterdrückung der Freisetzung von Antioxidantien, was die Konzentration an ROS ansteigen lässt.

RelA scheint auch im Darm für die Heilung der epithelialen Zellschicht verantwortlich zu sein und besitzt eine Art Schutzfunktion bei akuten Entzündungen, indem es einen effektiven Wundheilungsprozess vermittelt. Ohne *RelA* ist die Epithelschicht nicht in der Lage sich selbst zu regulieren und das Ausmaß der Entzündung zu begrenzen. Wie bereits erwähnt hat man herausgefunden, dass die dauerhafte Aktivierung von NF- κ B in den Epithelzellen und Myeloidzellen, z.B. bei chronischen, intestinalen Entzündungen die Ursache für die Entwicklung von entzündungs-assoziierten Krebs ist (Greten et al., 2004). Ein sich daraus ergebender therapeutischer Ansatz ist die Gabe von NF- κ B-Inhibitoren.

In vielen Publikationen wird ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorentstehung postuliert. Auch findet man deutliche Parallelen zwischen Wundheilungsprozess und der Karzinogenese. Nach Dvorak sind Tumore Wunden, die niemals heilen (Dvorak, 1986). Nun könnte man folgende These hinsichtlich einer früheren Entwicklung von Tumoren bei Wildtypmäusen im Vergleich zu transgenen Mäusen (*RelA*^{k5 Δ /k5 Δ}) aufstellen.

Der wiederholte Wundprozess, der bei Vorhandensein von *RelA* aktiviert wird, übt einen verstärkten Tumorpromotoreffekt aus (Fürstenberger et al., 1989). Viele Gene, die in der Wundheilung exprimiert werden, sind auch an der Entstehung maligner Plattenepithelkarzinome beteiligt (Fürstenberger et al., 1989). Die Freisetzung mitogener Signale löst die Proliferation initiiert Zellen aus. Bei der Aktivierung von NF- κ B über IKK β kommt es zur Förderung des Überlebens der Zelle, Zellproliferation und zur Hemmung der Apoptose. Das sind beste Voraussetzungen, dass sich Zellen mit irreversiblen Mutationen zu malignen Tumoren entwickeln können. NF- κ B konnte im aktivierten Zustand in normalen und Krebszellen nachgewiesen werden.

Weitere Funktionen betreffen die Angiogenese und Metastasierung (Huang et al., 2000). Er trägt demzufolge einen Teil zur Tumorentstehung bei, indem er die Entstehung von Papillomen initiiert und den Zeitpunkt der Entstehung von Papillomen beeinflusst. Beim Verlust von *RelA* ist die epidermale Homöostase gestört und man beobachtet eine erhöhte Apoptoserate und die spontane Entwicklung von spinözellulären Karzinomen (van Hogerlinden et al., 1999). Wir vermuten, dass die durch TPA aktivierte Apoptose über eine andere Signalkaskade für die spätere Entwicklung von Tumoren bei den *RelA*^{k5 Δ /k5} Mäusen, zuständig ist.

Ziehen wir noch mal einen Vergleich zum Dickdarm, inwieweit *RelA* bei der Karzinogenese Einfluss nimmt. Auch im Dickdarm kommt es über TNF α zur Stimulierung des klassischen NF- κ B-Signaltransduktionsweges in den Epithelzellen und myeloiden Zellen. Zu den wichtigsten Funktionen von NF- κ B im Darm gehört auch hier die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase, d.h. ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellteilung herzustellen und somit auch den Schutz vor einer schweren und akuten Entzündung zu gewährleisten (Steinbrecher et al., 2008). Beim Verlust von *RelA* kommt es zu einer Dysregulation der intestinalen Homöostase, die durch einen erhöhten Anstieg der Zellteilung und durch eine Abnahme der Expression antiapoptotischer Zielgene gekennzeichnet ist, was eine Erhöhung der Entzündungsrate zur Folge hat. Die Vermutung liegt auch hier nahe, dass *RelA* defiziente Epithelzellen die Tumorbildung verzögern. Zumal mehrere Versuche gezeigt haben, dass die Hemmung von NF- κ B vor chronischen, intestinalen Entzündungen schützt (Spehlmann und Eckmann, 2009) und die Tumorraten senkt (Greten et al., 2004). Als Gegenspieler steht hier aber noch die Apoptose, die aufgrund der Zerstörung der epithelialen Barriere auch die Entzündungssymptome erhöht und somit die Bedingungen für eine spätere Tumorentwicklung schafft. NF- κ B

konnte im aktivierten Zustand in den Darmkrebszellen nachgewiesen werden (Karin et al., 2002). Und auch bei chronischen Entzündungen, die eine Art Vorstufe zur Tumorentwicklung darstellen (Karin und Greten, 2005), setzt NF- κ B verstärkt Zytokine frei, die antiapoptotisch wirken (Karin und Lin, 2002). Die Wahrscheinlichkeit besteht, dass es mit NF- κ B in den Epithelzellen zu einer frühzeitigen Tumorentwicklung im Darm kommt, was wir auch in unseren Versuchen bezogen auf die Haut festgestellt haben. Man muss jedoch berücksichtigen, dass NF- κ B multiple Funktionen im Darm hat, die oft gegensätzlich sind. Die pathophysiologischen Bedingungen und die involvierten Zellen sind hier von entscheidender Bedeutung. Es werden weitere Versuche erforderlich sein, um den komplizierten Wirkmechanismus des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu erfassen.

Ziehen wir unsere Beobachtungen bezüglich der histochemischen Färbungen heran, lassen sich folgenden Aussagen machen.

Die Farbreaktionen mit dem Antikörper NF- κ B (A) sc-109 haben bestätigt, dass die inaktivierte Form von NF- κ B/p65 (RelA) hauptsächlich im Zytoplasma von gesundem Gewebe vorliegt. Liegt demzufolge keine Reizung oder Entzündung vor, so wird NF- κ B auch nicht aktiviert und kann demzufolge auch nicht in den Zellkern wandern. Die immunhistochemischen Färbungen haben aber auch gezeigt, dass die inaktivierte Form von NF- κ B/p65 (RelA) im Tumorgewebe vorliegen kann. Hier konnten wir eine intensivere Färbung des Tumorgewebes im Vergleich zum gesunden Hautgewebe beobachten, siehe Abbildung 3.63 links unten, was auf eine höhere Konzentration an NF- κ B/p65 (RelA) schließen lässt. Es ist anzunehmen, dass in einem bestimmten Tumorstadium das aktivierte NF- κ B/p64 (RelA) in den Zellen per Feedbackmechanismus wieder herunter reguliert wird. Unter Feedbackmechanismus versteht man, dass beim Vorliegen von hohen Konzentrationen an phosphorylierten NF- κ B das Gen für seinen Inhibitor I κ B α exprimiert wird. I κ B α bindet den aktivierten NF- κ B. Dabei kommt es zur Inaktivierung und nach Verlassen des Zellkernes befindet sich NF- κ B gebunden an I κ B α wieder in seiner gehemmten Form im Zytoplasma. Infolgedessen konnte auch inaktiviertes NF- κ B/p65 (RelA) im Tumorgewebe nachgewiesen werden. In einem Hautabschnitt, Abbildung 3.63, links unten, konnten wir sehen, dass die inaktivierte Form von NF- κ B/p65 (RelA) in normaler Haut nicht detektiert werden konnte. Hier ist eine Übergangszone zwischen gesundem Haut- und Tumorgewebe dargestellt, so dass die Annahme besteht, NF-

κ B/p65 (RelA) liegt hier bereits in der phosphorylierten Form vor. Die Umwandlung von gesunden Haut- zu Tumorgewebe setzt eine Aktivierung von NF- κ B/p65 (RelA) voraus.

Beim Detektieren der aktivierten Form von NF- κ B/p65 (RelA) zeigte die basale Zellschicht ein negatives Färbeverhalten im Vergleich zu den apikalen Zellschichten, siehe Abbildung 3.69 Mitte. Dies lässt sich folgendermaßen erklären. In den undifferenzierten Basalzellen mit hohem Zellteilungspotenzial wird zunächst NF- κ B/p65 (RelA) exprimiert und liegt in seiner inaktivierten Form vor. Erst in den suprabasalen Zellen liegt NF- κ B/p65 (RelA) phosphoryliert im Zytoplasma und Zellkern vor, weil er den Prozess der Differenzierung steuert (Seitz et al., 1998). Obwohl die phosphorylierte Form von NF- κ B/p65 (RelA) erst im Zellkern agieren kann, wird NF- κ B/p65 bereits im Zytoplasma phosphoryliert, um die transkriptionelle Aktivität zu erhöhen. Die immunhistochemischen Färbungen haben gezeigt, dass die phosphorylierte Form von NF- κ B/p65 in gesundem und krankem Gewebe nachweisbar ist in Abhängigkeit von der Phase des Signaltransduktionsweges und des Zellstadiums. Widmen wir uns zunächst der normalen gesunden Haut, so konnten wir in Abbildung 3.70 ein unterschiedliches Färbeverhalten beobachten. Die Dermis bei der transgenen Maus ist negativ gefärbt, während die Färbung der Dermis einschließlich Epidermis von der Wildtypmaus positiv ist. Obwohl beide Hautabschnitte eine Übergangszone von gesundem Haut- zu Tumorgewebe darstellen und damit bereits die aktivierte Form von NF- κ B/p65 im gesunden Hautgewebe vorliegt, Abbildung 3.70, links unten, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass der Prozess der Tumorpromotion in der normalen Haut der transgenen Maus, Abbildung 3.70, links oben, noch nicht stattgefunden hat. Betrachtet man nun das Tumorgewebe in Abbildung 3.70, links unten, dann ist eine deutliche positive und negative Färbung zu erkennen. Aktiviertes NF- κ B/p65 (RelA) spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung (Dolcet et al., 2005). Das beobachtete Färbeverhalten lässt sich vermutlich so erklären, dass NF- κ B/p65 zu Beginn der Tumorentwicklung zunächst stärker phosphoryliert wird und im Verlauf der weiteren Tumorstadien eine teilweise Downregulation von phosphorylierten NF- κ B/p65 erfolgt. Fraglich ist, wieso es aber auch zur Tumorentwicklung kommt, wenn *RelA* in der Epidermis deletiert wurde. Darauf werden vermutlich zahlreiche Faktoren einen Einfluss ausüben. Wir beschränkten uns bei dieser Arbeit auf die Komponenten IKK α/β und c-Jun. Der Nachweis von IKK α/β und c-Jun, sowohl in aktiver und

inaktiver Form vorliegend, per Antikörperfärbung in verschiedenen Hautstadien sollte uns helfen herauszufinden, welchen Einfluss diese beiden Komponenten bei der Tumorentstehung haben, siehe Abschnitt 4.2 und 4.3. Weitere Versuche sind jedoch erforderlich, um zum Beispiel die Auswirkungen bei zusätzlicher Deletion von IKK α/β und/oder c-Jun zu ergründen.

Es stellt sich des Weiteren die Frage wie sich die Tumorentwicklung nach Abbruch der TPA-Applikation verhält? Hier müssen wir zunächst zwei Arten von Tumoren differenzieren, die sich während des Versuches herausgebildet haben, zum einen reversible und zum anderen persistente Papillome (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995). Nach Ende der TPA-Applikation konnten wir in den darauffolgenden Wochen bei beiden Mauslinien eine Verkleinerung oder sogar komplette Rückbildung der Papillome feststellen. Diese Beobachtungen machte auch Burns und Kollegen (Burns et al., 1976) in ihren Versuchen. Einige Papillome benötigen die regelmäßige Zufuhr von TPA, um zu bestehen bzw. sich entwickeln zu können. Bleibt diese aus, kommt es zur Rückbildung. Ein Grund dafür könnte sein, dass ihre Zellwachstumsgeschwindigkeit, ohne Reiz durch den Promotor, nicht ausreicht, um der Zellverlustgeschwindigkeit entgegenzuwirken und sie zerstören sich dadurch faktisch selbst (Eversen, 1962 und Steel, 1968). Vermutlich ist der Organismus auch in der Lage, nach Abnahme der TPA-Konzentration bzw. Abbruch der TPA-Applikation die Kontrolle über das Teilungsverhalten zurückzugewinnen. Im Gegensatz dazu stellten sich etwa 5% der entwickelten Papillome als Vorstufen maligner Tumore heraus, indem sie ihr unkontrolliertes Wachstum spontan fortsetzten. Irreversible Mutationen sind bereits durch das DNS-schädigende Reagens DMBA entstanden und die vorliegende genetische Instabilität führt zu weiteren genetischen Veränderungen. Zum Beispiel verlieren sie ihre Apoptosefähigkeit. Dies erklärt das beobachtete Tumorstadium einige Wochen nach Beenden der TPA-Applikation.

Schließlich möchten wir noch die zu verzeichneten Todesfälle während der durchgeführten Versuche erwähnen, die Anreiz zu einer Diskussion bieten. Am Ende der Versuche konnten wir feststellen, dass bei den transgenen Mäusen (größtenteils ohne Papeln), die mit TPA behandelt wurden, eine geringfügig höhere Sterberate vorlag. Es ist bekannt, dass *RelA* defiziente neugeborene Mäuse oft versterben und vermutlich besteht hier ein Zusammenhang aufgrund der erhöhten Apoptoserate bei *RelA* defizienten Mäusen. Eine weitere Ursache könnte auch die sein, die ebenfalls

auf den Tod der mit TPA behandelten Wildtypmäuse zurückzuführen ist. DMBA kann eine Mutation im *ras*-Gen, ein Proto-Onkogen, auslösen. Eine Mutation speziell im *H-ras* Gen ist für die Hautkrebsentstehung verantwortlich (Bell et al., 2002; Budunova et al., 1999). Gelangt DMBA und TPA z.B. durch Aufkratzen der Haut in die Blutbahn, dann können durch deren Transport in andere Gewebe andere Krebsarten, wie z.B. Lungenkrebs, induziert werden, an denen vermutlich die Maustiere verstorben sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass DMBA durch eine *N-ras* Mutation in den Knochenmarkszellen Leukämie induzieren kann (Sugiyama et al., 2002). Hierzu müssten jedoch weitere Untersuchungen hinsichtlich der Todesursache durchgeführt werden. Der Tod von mit Azeton behandelten Mäusen lässt sich vermutlich anhand des sozialen Verhaltens von Mäusen erklären. Die verstorbenen männlichen Maustiere wurden in Gruppen gehalten. Es ist anzunehmen, dass es u.a. durch die reizende Wirkung von Azeton zur Aggressivität zwischen den Maustieren kam, die bis zu tödlichen Auseinandersetzungen führten (siehe auch: Latham und Mason, 2004).

Vergleicht man die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit mit aktueller wissenschaftlicher Literatur, so konnten die Funktionen des Transkriptionsfaktors NF- κ B größtenteils bestätigt werden. Xue und Kollegen (Xue et al, 2011) haben herausgefunden, dass die genetische Hemmung des NF- κ B Signalweges sowohl die Initiierung als auch die Aufrechterhaltung von Lungenkrebs beeinflusst. Durch die Hemmung der Untereinheit RelA/p65 kommt es zur reduzierten Expression der für die Zellteilung verantwortlichen NF- κ B Zielgene (c-Myc und Cyclin D1). Das Zellwachstum lässt folglich nach. Xue's Versuche, RelA/p65 in murinen Lungenadenokarzinomzelllinien mit einem Proteasominhibitor zu hemmen, führten zu einem Rückgang des Lungenkarzinoms. Bezogen auf unsere Ergebnisse können hier Parallelen gezogen werden. Eine Deletion von *RelA* in den Keratinozyten hat zu einer Verzögerung der Tumorentwicklung geführt. Diese wichtige Rolle von RelA/p65 bei der Krebsentstehung, speziell dessen Verantwortlichkeit bei der Entstehung von Lungenkrebs (Bassers et al., 2010), wird durch die Publikation von Meylan bekräftigt. Die Aktivierung von mutierten *K-ras* bei vorliegender genetischer Hemmung von NF- κ B führte zu einer verlangsamten Tumorprogression (Meylan et al., 2009). Gesamtbetrachtet kann eine Hemmung von NF- κ B zunächst die Tumorprogression eindämmen, eine dauerhafte Hemmung kann jedoch die Entwicklung von Tumoren nicht verhindern. Des Weiteren hat man herausgefunden, dass durch die Hemmung

von RelA/p65 verstärkt Apoptose auftrat und die Expression von NF- κ B Zielgenen, die für Entzündungsprozesse verantwortlich sind, nicht abnahm (Xue et al., 2011). Diese Erkenntnisse begründen die in unseren Versuchen vermehrt auftretenden Todesfälle und auffälligen Entzündungsreaktionen bei den transgenen Mäusen.

Eine Publikation von Li und Kollegen (Li et al., 2013) bestätigt ebenfalls die entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Regulation des Tumorwachstums. Die Versuche haben gezeigt, dass Myelozyten mit der Untereinheit RelA/p65 durch die Einwirkung krebserzeugender Stoffe ein verstärktes Tumorwachstum auslösten. Fehlte hingegen das Gen *RelA*, so war das Tumorwachstum in der Lunge weitestgehend gehemmt. Bei den Knockout Mäusen konnte man ebenfalls nachweisen, dass Gene, die an Apoptosesignalwegen beteiligt sind, verstärkt exprimiert wurden und es zur Reduktion der Expression von Zielgenen kam, die an der Zellteilung beteiligt sind.

Trotz der übereinstimmenden Forschungsergebnisse der oben genannten Publikationen und mit dieser Arbeit bezogen auf den entscheidenden Einfluss von NF- κ B bei der Tumorentstehung, muss berücksichtigt werden, dass die jeweilige Funktion von NF- κ B u.a. vom Zelltyp abhängt. Byg und Kollegen haben festgestellt, dass eine Aktivierung des NF- κ B Signalweges in humanen Primärkeratinozyten durch Papillomviren nicht auf humane Osteosarkomzellen übertragbar ist. In diesem Zelltyp kam es unter der Einwirkung von Papillomviren zur Runterregulierung der Aktivität von NF- κ B (Byg et al., 2012).

Anhand der vorliegenden Kenntnisse über den Transkriptionsfaktor NF- κ B kann man zusammenfassend sagen, dass die Aktivität von NF- κ B durch viele Faktoren beeinflussbar ist und dass deren Zusammenspiel von entscheidender Bedeutung ist. Des Weiteren ist die Funktion von NF- κ B zelltyp- und zellstadiumabhängig. Andere Komponenten des NF- κ B Signalweges und Komponenten von weiteren mitwirkenden Signaltransduktionswegen können die Funktion von NF- κ B beeinflussen und müssen genauer untersucht werden. Mögliche Funktionen von IKK α/β und c-jun bei Vorhandensein und Nichtvorhandensein von NF- κ B in den Keratinozyten werden in den folgenden zwei Abschnitten diskutiert.

4.2 Einfluss von IKK α/β bei der Entstehung von Hauttumoren

IKK α/β sind Kinasen, die Teil der NF- κ B-Signaltransduktionskaskade sind. Zu den Funktionen von IKK α gehört die Organogenese der sekundären Lymphorgane (Bonizzi und Karin, 2004) und sie besitzt die Fähigkeit, die Differenzierung der Keratinozyten zu kontrollieren (Hu et al., 2001). Sie ist eine Komponente des alternativen Signalweges, die die NF- κ B Untereinheiten p52/RelB freisetzt. Die entscheidende Rolle spielt IKK β , da sie durch Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α , den Transkriptionsfaktor NF- κ B mit den Untereinheiten p50/RelA freisetzt.

Anhand der immunhistochemischen Färbungen, Abbildung 3.74, links unten, und Abbildung 3.76, links oben, wurde bestätigt, dass die inaktivierte Form von IKK α/β sowohl in gesundem Hautgewebe als auch im Tumorgewebe vorliegt. Es erscheint zunächst als ungewöhnlich, dass nicht phosphoryliertes IKK α/β in relativ hohen Konzentrationen im Tumorgewebe vorhanden ist, wenn man berücksichtigt, dass das phosphorylierte IKK α/β entscheidend für die NF- κ B/p65 (RelA) Aktivierung ist und dieses eine für die Tumorentwicklung wichtige Rolle spielt. Beziehen wir uns aber auf die oben gemachten Aussagen, lässt sich diese Erscheinung wie folgt erklären. Wir nehmen an, dass aktiviertes NF- κ B/p65 am Anfang der Tumorentstehung einen großen Einfluss ausübt und in diesem Stadium verstärkt nachweisbar ist. Danach könnte vermutlich die Konzentration an aktivierter IKK β ebenfalls abfallen.

Es ist bekannt, dass IKK β über einen Feedback-Mechanismus verfügt. Ist IKK β schon mal aktiviert und liegt in hohen Konzentrationen vor, auch aufgrund einer Hemmung des Signalweges, phosphoryliert sich IKK β selbst an seiner inhibitorischen Domäne, begrenzt so die Dauer der IKK β Aktivierung und senkt die Kinase-Aktivität (Delhase et al., 1999). Eine völlige Dephosphorylierung an den Serinen 176/180 und 177/181 führt wieder zur Inaktivität (Häcker und Karin, 2006).

Eine weitere Beobachtung, siehe Abbildung 3.75, links unten, und Abbildung 3.77 oben, haben wir bei beiden Mauslinien an der Übergangszone von normaler Epidermis hin zu einem Plattenepithelkarzinom gemacht. Die normale Epidermis ist negativ gefärbt und somit liegt kein IKK α/β vor. Vermutlich liegt hier bereits die aktivierte Form von IKK α/β vor, die den Tumorprozess ansteuert.

Bei der Detektion der phosphorylierten Form von IKK β konnten wir feststellen, dass das Tumorgewebe der transgenen Maus (*RelA*^{k5 Δ /k5 Δ}) stärker angefärbt war im

Vergleich zu der Wildtypmaus, siehe Abbildung 3.78. Außerdem konnte im Tumorgewebe der Wildtypmaus nur vereinzelt Phospho- IKK α/β nachgewiesen werden.

Die intensive Anfärbung des Tumorgewebes der transgenen Maus, Abbildung 3.78 links oben, lässt annehmen, dass hier ein Stadium abgebildet ist, in dem es zur Überproduktion von phosphorylierten IKK β kommt. Dies erfolgt aufgrund der dauerhaften Stimulierung von TNF α durch TPA und einer Blockade im Signaltransduktionsweg durch Deletion von *RelA*.

Das Tumorgewebe der Wildtypmaus war schwach bis negativ gefärbt. Offensichtlich war der Feedbackmechanismus wieder aktiviert, der die Umwandlung in die inaktivierte Form steuert.

Im normalen Hautgewebe konnte Phospho-IKK α/β auch vereinzelt detektiert werden, siehe Abbildung 3.79, was auf einen beginnenden Entzündungsprozess zurückzuführen ist, nachdem die Haut mit TPA behandelt wurde. Die Abbildungen in Abschnitt 3.4.6.1 haben gezeigt, dass phosphoryliertes IKK α/β in einer höheren Konzentration in der Epidermis von transgenen Mäusen sowohl im Tumorgewebe, als auch im gesundem Hautgewebe vorliegt, wenn *RelA* in der Epidermis deletiert wurde. Hier ist eine Überexpression von IKK α/β zu vermuten, da RelA aufgrund seines Fehlens nicht aktiviert werden kann.

Anhand der gemachten Beobachtungen wurde gezeigt, dass IKK β eine bedeutende Rolle bei der Regulierung des klassischen NF- κ B- Signaltransduktionsweges spielt.

4.3 Einfluss von c-Jun bei der Entstehung von Hauttumoren

c-Jun bildet als Homodimer den Transkriptionsfaktor AP-1. TPA stimuliert AP-1. Dies führt über die Aktivierung der PKC-Raf-ERK Kaskade zu einer Erhöhung der Apoptoserate. Wir nehmen an, dass bei Fehlen von *RelA* (Deletion in den Keratinozyten) es auf diesem Weg aufgrund der dauerhaften Stimulierung durch TPA zur Auslösung von apoptotischen Signalen kommt. NF- κ B besitzt die Fähigkeit die Dauer der JNK Aktivierung zu kontrollieren (Kamata und Hirata., 1999). Zum anderen sorgt die Stimulierung durch TPA zur Aktivierung von c-Jun über die PKC-Raf-JNK Kaskade und steuert die Proliferation der Keratinozyten. Somit ist c-Jun bei der Karzinomentstehung involviert. Da c-Jun neben der Regulation der Proliferation auch Apoptose auslösen kann, sind die Funktionen Zelltod und Zellteilung als kontrovers zu betrachten. Wann welche Gene exprimiert werden, hängt von den bestehenden Umständen ab. C-Jun wird nicht exprimiert, wenn das Hautgewebe nicht mit TPA stimuliert wurde, siehe Abbildung 3.83.

Der in Abbildung 3.82 links oben erkennbare gesunde Hautabschnitt mit negativen Färbeverhalten der Zellkerne führt zur Annahme, dass es sich hier wieder um eine Übergangszone vom gesunden zum kranken Gewebe handelt, wo c-Jun bereits im aktivierten Zustand vorliegt oder noch nicht exprimiert wurde. Die Detektion von c-Jun im Zellkern mit Antikörpern führte zu dem Ergebnis, dass c-Jun sowohl in seiner aktivierten als auch inaktivierten Form im Tumorgewebe von transgenen Mäusen und Wildtypmäusen vorliegt, siehe Abbildung 3.82, Abbildung 3.84 und Abbildung 3.85. Hiermit wird die Vermutung nochmals bestätigt, dass NF- κ B/p65 (*RelA*) seine antiapoptotischen Eigenschaften durch die negative Regulierung von JNK steuert. Dadurch könnte es verstärkt zur Proliferation über c-Jun kommen, was die Tumorentstehung fördert. Kommt es zum Verlust von *RelA*, dann äußert sich das in einer verstärkten JNK Aktivierung bzw. MAPK Signalweg Aktivierung (Waterfield et al., 2003) durch TPA-Stimulierung mit anschließender Apoptoseinduzierung. Letztendlich lässt sich vielleicht eine spätere Entwicklung von Tumoren bei transgenen Mäusen unter anderem auch damit erklären, dass c-Jun zusätzlich die Zellteilung stimuliert hat.

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Mausmodellstudien haben bestätigt, dass die Komponenten des NF- κ B Signalweges für das Überleben bzw. Aufrechterhalten verschiedener Krebsarten erforderlich sind (Meylan et al., 2009). In der Haut hat NF- κ B eine duale Funktion, indem er dafür sorgt, dass die Homöostase aufrechterhalten wird und dass die angeborene Immunantwort schnell erfolgt (Paspakaris, 2009). Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorentwicklung in der Haut ausübt (Bell et al., 2002). Das Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, welche Rolle speziell die Untereinheit RelA (p65) des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von spinözellulären Karzinomen der Haut spielt. Für unsere Untersuchungen wurden zum Vergleich zwei Mauslinien mit dem genetischen Hintergrund (C57BL/6) herangezogen, bei denen unter der Verwendung des Tumorinitiators DMBA und des Tumorpromotors TPA (unterschiedliche Applikationsfrequenz und Konzentration) Hauttumore induziert wurden. Über mehrere Wochen wurden die Hautveränderungen der transgenen Mäuse (*RelA*^{k5 Δ /k5 Δ}), bei denen das Gen *RelA* in der Epidermis deletiert wurde, und der Wildtypmäuse (C57BL/6) beobachtet und miteinander verglichen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass NF- κ B bzw. die Untereinheit RelA eine bedeutende Funktion bei der Entstehung von Hauttumoren hat. Sie stellt sozusagen einen wichtigen Initiator für die Erstentstehung von Tumoren dar. In fast allen unseren Versuchen kam es bei den Wildtypmäusen zu einer früheren Entwicklung von Papillomen. Der Zeitabstand im Mittel betrug 4 Wochen bis es zur Entstehung von Papillomen bei den transgenen Mäusen (*RelA*^{k5 Δ /k5 Δ}) kam, wenn TPA zweimal pro Woche appliziert wurde. Dagegen betrug bei einer erhöhten Konzentration und dreimaligen Applikation von TPA pro Woche der Zeitabstand im Mittel 0-3,5 Wochen bis die transgenen Mäuse erstmalig Papillome entwickelten. Zusätzlich beobachteten wir bei beiden Mauslinien die Erstentstehung von Papillomen zu einem noch früheren Zeitpunkt und dass eine Erhöhung der Promotorkonzentration und dessen häufigere Applikation das Tumorwachstum beschleunigte.

Weitere Ergebnisse waren die höhere Tumorrates bei den Wildtypmäusen, was unter anderem auf die antiapoptotischen und fördernden Eigenschaften des Überlebens der Zelle von NF- κ B zurückgeführt werden kann.

Außerdem unterliegen RelA exprimierte Keratinozyten einem zusätzlichen Tumorpromotoreffekt, indem NF- κ B den Wundheilungsprozess stimuliert und dadurch weitere Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Die transgenen Mäuse mit deletierten *RelA* in der Epidermis wiesen verstärkt Entzündungsprozesse und Hyperplasien auf. Bei der Untersuchung der Tumorgroße konnten bei beiden Mauslinien keine großen Unterschiede festgestellt werden. Anhand der immunhistochemischen Färbungen konnte beobachtet werden, dass NF- κ B/p65 (RelA) zu Beginn der Tumorentwicklung zunächst stärker phosphoryliert wird und im Tumorgewebe teilweise wieder herunter reguliert wird. Die Aktivierung von NF- κ B/p65 hängt demzufolge vermutlich von dem jeweiligen Hautstadium ab und spielt besonders in der Übergangsphase von gesunder Haut hin zu kranker Haut eine entscheidende Rolle. Ergänzend sollte erwähnt werden, dass alle von uns durchgeführten Versuche gezeigt haben, dass TPA eine wichtige Rolle beim Wachstum der Tumore bzw. Aktivierung von NF- κ B spielen muss, zumal wir jedes Mal beim Abbruch der TPA-Applikation folgendes Phänomen beobachteten: Stagnation im Wachstum der Tumore, über Verkleinerung bis hin zur Rückbildung. Nur ein kleiner Teil der entstandenen Papillome bei beiden Mauslinien entwickelte sich zu bösartigen Tumoren.

Die Ergebnisse von verschiedenen Karzinogenesemodellen der Haut und auch des Intestinaltraktes haben gezeigt, dass NF- κ B über multiple Funktionen verfügt, die Tumorgenese fördern und auch hemmen können. Hauptsächlich das Zusammenspiel verschiedener Faktoren, wie z.B. die pathologischen Bedingungen, die involvierten Zelltypen, entscheidet darüber, welche Funktion zum Tragen kommt. Die Erkenntnisse, die mit dieser Arbeit gewonnen wurden, wurden durch die gemachten Beobachtungen anderer Publikationen (Li et al., 2013; Xue et al., 2011; Bassers et al. 2010 und Bell et al. 2002) bestätigt. Das Fehlen der Untereinheit RelA (p65) kann zunächst eine Tumorentstehung hinauszögern, aber letztendlich nicht verhindern. Zunächst scheint der Ansatz sinnvoll, NF- κ B-Inhibitoren zu entwickeln, damit die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen reduziert wird und starke Entzündungsprozesse und/oder die Entstehung von Tumoren eingedämmt werden. Eine Hemmung des NF- κ B-Faktors führt jedoch wiederum zu Nebenwirkungen/Änderungen im Mechanismus der Signaltransduktionskaskade, die zu neuen Krankheiten führen kann. Die Regulierung des NF- κ B Signalweges ist sehr komplex und interagiert mit anderen Signalwegen (Oeckinhaus et al. 2011). Es wird

ein interessantes Projekt sein, unsere Versuche bei konstant bleibender Gruppengröße zu wiederholen, um die Ergebnisse zu bestätigen und um weitere Faktoren, wie andere involvierte Zelltypen, parallel geschaltete Signaltransduktionswege, andere NF- κ B genetische Mutationen und/oder NF- κ B Zielgen Expressionen, zu charakterisieren, die einen Einfluss auf die Krebsentstehung haben. Nur so ist es möglich, selektiv wirkende Arzneimittel mit dem Angriffspunkt NF- κ B Signalweg gegen chronische Entzündungen und Krebs entwickeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987): Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729-739
2. Angel, P., Karin, M. (1991): The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta* 1072: 129-157
3. Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M. S., Bachelier, F., Thomas, D. and Hay, R. T. (1995): Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B. *Mol Cell Biol.* 15: 2689-2696
4. Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hey, R. T., Virelizier, J. L. and Dargemont, C. (1997): Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* 110: 369-378
5. Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988): I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 242: 540-546
6. Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994): Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179
7. Ball, A.R. Jr., Bos, T.J., Löliger, C., Nagata, L. P., Nishimura, T., Su, H., Tsuchie, H. and Vogt, P. K. (1988): Jun: oncogen and transcription regulator. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53: 687-695
8. Bassers, D.S., Ebbs, A., Levantini, E., Baldwin, A.S. (2010): Requirement of the NF- κ B subunit p65RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 70: 3537-3546
9. Baldwin, A. S., Jr. (1996): The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 649-683
10. Baldwin AS Jr. (2001): Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest.* 107(1): 3-6

11. Baldwin, A.S. (2001): Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* 107(3): 241-6
12. Bauer KH: „Mutationstheorie der Geschwulstentstehung.“ Springer, Berlin 1928
13. Bedi, R., Butterworth, M., Craig, G., Langdon, J., Lowndes P. and Nolan, A. (2000): Opportunistic oral cancer screening. In Occasional Paper. British Dental Association: 1-36
14. Beinke, S. and Ley, S.C. (2004): Functions of the NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J.*, 382: 393-409
15. Bell, S., Degitz, K., Quirling, M., Jilg, N., Page, S., Brand, K. (2002): Involvement of NF- κ B signaling in skin physiology and disease, *Cellular Signalling* 15:1-7
16. Ben Neriah, Y. (2002): Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* 3: 20-26
17. Berenblum, I. (1941): The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res.* 1: 44-51
18. Berenblum, I. (1941): The mechanism of carcinogenesis: A study of the significance of carcinogenic actions and related phenomena. *Cancer Res* 1: 807-814
19. Binetruy, B., Smeal, T. and Karin, M. (1991): Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature* 351: 122-127
20. Blumberg P.M. (1991): Complexities of the protein kinase C pathway. *Mol. Carcinog.* 4: 339-344
21. Bonizzi, G. and Karin, M. (2004): The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280-288
22. Boutwell R.K. (1985): Tumor promoters in human carcinogenesis. De Vita. V.T. Jr., Hellmann, S. and Rosenberg, S.A. (eds), *Important Advances in Oncology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia: 16-27
23. Boutwell, R.K. (1964): Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res.* 4: 207-250
24. Boveri T. (1914): „Zur Frage der Entstehung maligner Tumore.“, Gustav Fischer, Jena

25. Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., and Siebenlist, U. (1993): Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2532-2536
26. Budunova, I. V., Perez, P., Vaden, V. D., Spiegelman, V. S., Slaga, T. J., Jorcano, J. L. (1999): Increased expression of p50-NF- κ B and constitutive expression of NF- κ B transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 18: 7423-7431
27. Burns, F. J., Vanderlaan, M., Sivak, A. and Albert, R. E. (1976): Regression kinetics of mouse skin papillomas. *Cancer Res.* 36: 1422-1426
28. Byg, L. M., Vidlund, J., Vasiljevic, N., Clausen, D., Forslund, O., Norrild, B. (2012): NF- κ B signalling is attenuated by E7 protein from cutaneous human papillomaviruses. *Virus Research* 169: 48-53
29. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D. (1996): A genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 56: 2488-2492
30. Cerutti, P.A. (1985): Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227 (4685): 375-381
31. Chen, Y., Wu, Q., Song, S.-Y., Su, W.-J. (2002): Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 1014-1018
32. Chiao, P. J., Miyamoto, S. and Verma, I. M. (1994): Autoregulation of I κ B α activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 28-32
33. Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. and Maniatis, T. (1995): Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9: 899-909
34. Cox, J.A., Jeng, A.Y., Sharkey, N.A., Blumberg, P.M., Tauber, A.I. (1985): Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *Journal of Clinical Investigation* 76: 1932-1938
35. Curnutte, J.T., Erickson, R.W., Ding, J., Badwey, J.A. (1994): Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH-oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry* 269:10813-10819

36. Das, B.R., Nagpal, J.K. (2002): Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 8: 258-267
37. Dekker, L.V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J., Segal, A.W. (2000): Protein kinase C- β contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochemical Journal* 347: 285-289
38. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M. (1999): Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-313
39. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997): A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388: 548-554
40. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. and Matias-Guiu, X. (2005): NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446: 475-483
41. Domann, F., Levy, J., Birrer, M., Bowden, G. (1994): Stable expression of a c-jun deletion mutant in two malignant mouse epidermal cell lines blocks tumor formation in nude mice. *Cell Growth Differ* 5 (1): 9-16
42. Duran, H.A., De Rey, B.M. (1991): Differential oxidative stress induced by two different types of skin tumour promoters benzoyl peroxide and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 12: 2047-2052
43. Dvorak, H. F. (1986): Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315: 1650-1659
44. Ebinu, J.O., Bottdorf, D. A., Chan, E.Y., Stang, S. L., Dunn, R. J. and Stone, J. C. (1998): RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280: 1082-1086
45. Egan, L. J., de Lecea A., Lehrmann, E. D., Myhre, G. M., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F. (2003): Nuclear factor- κ B activation promotes restitution of wounded intestinal epithelial monolayers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: 1028-1035
46. Eversen, A. (1962): Effects of carcinogens on cell proliferation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 156: 95-184
47. Friedberg, E.C., Walker, G. C.; Siede, W., Schultz, R. A. (2006): DNA repair and mutagenesis. (2nd ed.). ASM Press

48. Fürstenberger, G. and Kopp-Schneider, A. (1995): Malignant progression of papillomas induced by the initiation-promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis* 16: 61-69
49. Fürstenberger, G., Rogers, M., Schnappke, R., Bauer, G., Hofler, P. and Marks, F. (1989): Stimulatory role of transforming growth factors in multistage skin carcinogenesis: Possible explanation for the tumor-inducing effect of wounding in initiated NMRI mouse skin. *Int. J. Cancer* 43: 915-921
50. Ganchi, P. A., Sun, S. C., Greene, W. C. and Ballard, D. W. (1993): A novel NF- κ B complex containing p65 homodimers: implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization. *Mol. Cell Biol.* 13: 7826-7835
51. Ghosh, S. and Karin, M. (2002): Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109: 81-96
52. Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998): NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260
53. Gitter, A.H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D., Fromm, M. (2000): Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J.* 14: 1749-1753
54. Grafström, R.C., Norén U.G., Zheng X., Elfving A., Sundqvist K. (1996): Growth and transformation of human oral epithelium in vitro. In: Müller-Hermelink, Neumann H.G., Dekant (eds): *Recent Results in Cancer Research. Risk and Progression Factors in Carcinogenesis*: 275-306
55. Greten, F.R., Eckmann L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., et al. (2004): IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118: 285-296
56. Grilli, M., Chen-Tran, A. and Lenardo, M. J. (1993): TNF α mediates a Tcell receptor – independent induction of the gene regulatory factor NF- κ B in T Lymphocytes. *Mol Immunol* 30: 1287-1294
57. Guberman, A.S., Scassa, M.E., Canepa, E.T. (2005): Repression of 5-aminolevulinate synthase gene by the potent tumor promoter, TPA, involves multiple signal transduction pathways. *Arch Biochem Biophys* 436: 285-296

58. Gumpert, N. M. (2000): Funktionelle Bedeutung der Protein Kinase C- δ (PKC- δ) in der Reorganisation der zytoskelettären Architektur humaner Keratinozyten. Dissertation, Institut für Toxilogie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
59. Ha, P.A., Califano, J.A. (2003): The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 14: 363-369
60. Häcker, H. and Karin, M. (2006): Regulation and Function of IKK an IKK-related Kinases. *Sci. STKE* 357
61. Hatano, E., Bennett, B. L., Manning, A. M., Qian, T., Lemasters, J. J. and Brenner, D. A. (2001): NF- κ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF α - and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 120: 1251-1262
62. Hayden, M. S. and Gosh, S. (2004): Signaling to NF- κ B. *Gene Dev* 18: 2195-2224
63. Hecker, E. and Schmidt, R. (1974): Phorbolester – the irritans and cocarcinogens of croton tigilium. L. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* 31: 377-467
64. Hecker, E. (1984): Co-carcinogens of the initiation- (or tumor)promoter type as environmental risk factors of cancer in man, experimental analysis of an etiologic model situation of life style cancer and current problems of assessment of cancer risk in multifactorial carcinogenesis. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 55: 145-164
65. Hergenhausen M., Klotz, U., Fellhauer, M., Tremp, G.L. and Hecker, E (1991): Toxicodynamics of tumour promoters of mouse skin. II. Binding to protein kinase C of some new diterpene esters and induction of luminol-enhanced chemoluminescence in mouse peritoneal neutrophils. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology* 117: 385-395
66. Hibi, M., Lin, A., Smeal T., Minden, A., Karin, M. (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development*. 7: 2135-2148
67. Ho, C., Slater, S.J., Stagliano, B.A., Stubbs, C.D. (1999): Conformation of the C 1 phorbol-ester binding domain participates in the activating conformational change of protein kinase C. *Biochemical Journal* 344: 451-460

68. Hofmann, A.M.(2000): Nachweis der Feldkanzerierung im oberen Aerodigestivtrakt mit Hilfe des Mikrokerntestes. Dissertation, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: 1-80.
69. Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. (1999): Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* 284: 316-320
70. Hu, Y. L., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K., and Karin, M. (2001): IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* 410: 710-714
71. Huang, C., Ma,W.Y., Hanenberger, D., Cleary, M.P., Bowden, G.T. and Dong, Z. (1997): Inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 (AP-1) activity by aspirin inAP-1 luciferase transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 272: 26325-26331.
72. Huang, C., Ma W.Y., Dong Z. (1997): Signal transduction through atypical PKCs, but not the EGF receptor, is necessary for UVC-induced AP-1 activation in immortal murine cells. *Oncogene* 14: 1945-1954
73. Huang, R.P., Peng, A., Hossain, M.Z., Fan, Y., Jagdale, A., Boynton, A.L. (1999): Tumor promotion by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis* 20: 485-492
74. Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D. and Fidler, I. J. (2000): Blockade of NF- κ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by supressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res.* 60: 5334-5339
75. Israël, A. (2000): The IKK complex: An integrator of all signals that activate NF- κ B. *Trends in Cell Biology* 10: 129-133
76. Israël, A. (2010): The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(3): a000158
77. Kamata, H., et al. (2005): Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120: 649-661
78. Kamata, H. and Hirata, H. (1999): Redox regulation of cellular signaling. *Cell. Signal* 11:1-14

79. Karin, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270: 16483-16486
80. Karin, M. (2006): Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*: 431-436
81. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology* 18: 621-663
82. Karin, M. and Delhase, M. (2000): The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: Key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in Immunology* 12: 85-98
83. Karin, M., Liu, Zg. Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology.* 9: 240-246
84. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.-W. (2002): NF- κ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews*: 301-310
85. Karin, M. and Lin, A. (2002): NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3: 221-227
86. Karin, M. and Greten, F. R. (2005): NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 5: 749-759
87. Kaul, A. and Khanduja, K. (1998): Polyphenols inhibit promotional phase of tumorigenesis: Relevance of superoxide radicals. *Nutrition and Cancer* 32: 81-85
88. Kazanietz, M.G., Wang, S., Laskin, Gardner (1987): Induction of chemotaxis in mouse peritoneal macrophages by activators of Proteinkinase C. *Journal of Leukocyte Biology* 41(6): 474-480
89. Kensler, T.W., Trush, M.A. (1984): Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environmental Mutagenesis* 6: 593-616
90. Kinzel, V., Richards, J., Marks, F., Fürstenberger, G. (1985): Mechanistic aspects of the delay in the G2 phase of the cell cycle caused by tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in HeLa cells. *Carcinogenesis* 6: 1375-1378
91. Kitajima, S., Takuma, S., Morimoto, M., (1999): Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextrane sulfate sodium. *Exp. Anim.* 48: 137-143

92. Kopp, E. B. and Medzhitov, R. (1999): The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 13-18
93. Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988): The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336: 646-651
94. Kozumbo, W.J., Trush, M.A., Kensler, T.W. (1985): Are free radicals involved in tumor promotion? *Chemico-Biological Interactions* 54: 199-207
95. Krauter, G., Von der Lieth, C.W., Schmidt, R., Hecker, E. (1996): Structure/activity relationships of polyfunctional diterpenes of the tiglane type. A pharmacophore model for protein-kinase-C activators based on structure/activity studies and molecular modelling of the tumor promoters 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and 3-O-tetradecanoylingenol. *European Journal of Biochemistry* 242: 417-427
96. Kunsch, C., Ruben, S. M. and Rosen, C. A. (1992): Selection of optimal κ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- κ B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 12: 4412-4421
97. Kuo, M.L., Huang, T.S., Liu, J.K. (1996): Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1317: 95-100
98. Kustikova, O., Kramerov, D., Grigorian, M., Berezin, V., Bock, E., Lukanidin, E., Tulchinsky, E. (1998): Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 18: 7095-7105
99. Laskin, D.L., Gardner, C. R., Laskin, J.D. (1987): Induction of chemotaxis in mouse peritoneal macrophages by activators of Protein kinase C. *Journal of Leukocyte Biology* 41: 474-480
100. Latham, N. and Mason, G. (2004): From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci* 86: 261-289
101. Lee, E., Park, K., Lee, J., Chun, K., Kang, J., Lee, S., Surh, Y. (1998): Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by *Alpinia oxyphylla* Miquel (Zingiberaceae). *Carcinogenesis* 19: 1377-1381

102. Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C., and Maniatis, T. (1998): MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9319-9324
103. Li, N. and Karin, M. (1999): Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB Journal* 13: 1137-1143
104. Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., and Verma, I. M. (1999): Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 284: 321-325
105. Li, R. C. X., Ping P., Zhang J., Wead W. B., Cao X., Gao J., Zheng Y., Huang S., Han J. and Bolli R. (2000): PKC ϵ modulates NF- κ B and AP-1 via mitogen-activated protein kinase in adult rabbit cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H1679-H1689
106. Li, Y., Kang, J., Friedman, J., Tarassishin, L., Ye, J., Kovalenko, A., Wallach, D. and Horwitz, M. S. (1999): Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF- κ B activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *PNAS* 96: 1042-1047
107. Li, Z. W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999): The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor- κ B activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* 189: 1839-1845
108. Liu, J.Y., Lin, S.J., Lin, J. K. (1993): Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis* 14: 857-861
109. Li, D., Beisswenger, C., Herr, C., Hellberg J., Han, G., Zakharkina, T., Voss, M., Wiewrodt, R., Bohle, R.M., Menger, M. D., Schmid, R. M., Stöckel, D., Lenhof, H.-P., Bals, R. (2013): Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/ β -catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene* 1-10
110. Löffler G., Petrides P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2003: 1160-1176
111. Lorenzo, P. S., Beheshti, M., Pettit, G. R., Stone, J. C. and Blumberg, P. M. (2000): The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high -affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol. Pharmacol.* 57: 840-846

112. Lukowski, R., Weber S., Weinmeister P., Feil S. und Feil R.: Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München: Cre/loxP – vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP – Signalweges in der Maus: BIOSpektrum 3/05: 287-290
113. Marks, F. and Fürstenberger, G. (2000): Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. Eur. J. Cancer 36 : 314-329
114. Marks, F. and Gschwendt, M. (1995) : Protein kinase C and skin tumor promotion. Mutation Research 33 (1-2) : 161-172
115. Marks, F. and Furstenberger, G. (1995): Tumor promotion in skin. In Chemical Induction of Cancer, Birkhäuser, Boston: 125-160
116. Matesic, D.F., Rupp, H.L., Bonney, W.J., Ruch, R.J., Trosko, J.E. (1994): Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. Mol Carcinog. 10(4): 226-36
117. May, J. and Ghosh, S. (1999): I κ B Kinases: Kinsmen with different crafts. Science 284: 271-273
118. Mercurio, F., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Young, D. B., Li, J. W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M., and Manning, A. M. (1999): I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. Mol Cell Biol 19 (2): 1526-1538
119. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A (1997): IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. Science 278 (5339): 860-866
120. Messer, G. and Rupec, R. A. (2001): NF- κ B I. Funktion und Regulation. Hautarzt 52: 677-685
121. Meylan, E., Dooley, A. L., Feldser, D. M., She, L., Turk, E., Ouyang, C. and Jacks, T. (2009): Requirement for NF- κ B signaling in a mouse model of lung adenocarcinoma. Nature 462: 104-107

122. Nakamura, Y., Colburn, N.H., Gindhardt, T.D. (1985): Role of reactive oxygen in tumor promotion: Implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 6: 229-235
123. Nakamura, Y., Kawamoto, N., Ohto, Y., Torikai, K., Murakami, A., Ohigashi, H. (1999): A diacetylenic spiroketal enol ether epoxide, AL-1, from *Artemisia lactiflora* inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion possibly by suppression of oxidative stress. *Cancer Lett.* 140(1-2): 37-45
124. Naumann, M., Scheidereit, C. (1994): Activation of NF- κ B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* 13: 4597-4607
125. Nolan, G. P. and Baltimore, D. (1992): The inhibitory ankyrin and activator Rel proteins. *Curr Opin Genet Dev* 2: 211-220
126. Oeckinhaus, A., Hayden, M.S. and Gosh, S. (2011): Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 12: 695-708
127. Ohkawa, Y., Iwata, K., Shibuya, H., Inui, N. (1985): Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced nitroblue tetrazolium reduction in mouse peritoneal macrophages by various tumor promotion inhibitors. *Cancer Lett.* 27: 45-52
128. Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors, *Oncogene* 18: 6853-6866
129. Pahl, H. L. and Baeuerle, P. A. (1997): The ER-overload response: activation of NF- κ B. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 63-67
130. Pandolfi, F., Tretin, L., Boyle, L.A., Stamenkovic, I., Byers, H. R. and Colvin, R. V. et al. (1993). *Cancer* 69: 1165-1173
131. Park, E., Liu, B., Xia, X., Zhu, F., Jami, W.B. Hu, Y. (2011): Role of IKK α in skin squamous cell carcinomas. *Future Oncology* 7(1): 123-134
132. Paspakaris, M. (2009): Regulation of tissue homeostasis of NF- κ B signaling: implications for inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 9: 778-788
133. Pérez, M.A., Raimondi, A.R., Itoiz, M.E. (2005): An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med* 34: 17-22

134. Perkins, N. D. (2004): NF- κ B : Tumor promotor or supressor? Trends Cell Biol. 14 (2): 64-69
135. Potten, C.S. and Loeffler, M. (1990): Stem Cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. Development 110: 1001-1020
136. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch (2004), Waltern de Gruyter, Berlin, New York
137. RamaKrishna, N. M., Devanesan, P. D., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Jeong, H., Jankowiak, R., Small, G. J. (1992): Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. Chem Res Toxicol. 5 (2): 220-226
138. Rambaratsingh, R. A., Stone, J.C., Blumberg, P.M. and Lorenzo, P. S. (2003): RasGRP1 represents a novel non-protein kinase C phorbol ester signaling pathway in mouse epidermal keratinocytes. J Biol Chem. 278 (52): 52792-52801
139. Rebholz, B., Haase, I., Eckelt, B., Paxian, S., Flaig, M. J., Ghoreschi, K., Nedospasov, S. A., Mailhamer, R., Debey-Pascher, S., Schultze, J. L., Weindl, G., Förster, I., Huss, R., Stratis, A., Ruzicka, T., Röcken, M., Pfeffer, K., Schmid, R. M. and Rupec, R. A. (2007): Crosstalk between keratinocytes and adaptive immune cells in an I κ B α protein-mediated inflammatory disease of the skin. Immunity 27 (2): 296-307
140. Reeves, E.P., Dekker, L.V., Forbes, L.V., Wientjes, F.B., Grogan, A., Pappin, D.J., Segal, A.W. (1999): Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils, Biochem J 344: 859-866
141. Rodriguez, M. S., Thompson, J., Hay, R. T., and Dargemont, C. (1999): Nuclear retention of I κ B α protects it from signal-induced degradation and inhibits NF- κ B transcriptional activation. J Biol Chem 274: 9108-9115
142. Rothwarf, D. M. and Karin, M. (1999): The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. Sci STKE (5): re1
143. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998): IKK γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. Nature 395: 297-300
144. Ruch, R.J., Klaunig, J.E. (1986): Effects of tumor promoters, genotoxic carcinogens and hepatocytotoxins on mouse hepatocyte intercellular communication. Cell Biol Toxicol 2(4): 469-483

145. Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. (1989): Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10(6): 1003-1008
146. Schwenk, F., Baron, U. and Rajewsky, K. (1995): A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of *loxP* - flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23: 5080-5081
147. Schwitalla, S., Fingerle, A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S., Ziegler, P., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D., Moreaux, G., Rupec, R., Gerhard, M., Schmid, R., Barker, N., Clevers, H., Lang, R., Neumann, J., Kirchner, T., Taketo, M., van den Brink, G., Sansom, O., Arkan, M., Greten, F. (2013): Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-like Properties. *Cell* 152(1-2): 25-38
148. Seitz, C.S., Lin, Q., Deng, H. and Khavari, P.A. (1998): Alterations in NF- κ B function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF- κ B. *Proc Natl Acad. Sci, USA* 95: 2307-2312
149. Seitz, C.S., Freiberg, R.A., Hinata, K., Khavari, P.A. (2000): NF- κ B determines localisation and features of cell death in epidermis. *J. Clin Invest.* 105: 253-260
150. Sen, R. and Baltimore, D. (1986): Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928
151. Shaulian, E. and Karin, M. (2001): AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* 20: 2390-2400
152. Siebenlist, U. (1997): NF- κ B/I κ B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta.* 1332 (1): R 7-13
153. Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. (1994): Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 405-455
154. Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. and Stark, G. R. (2002): Distinct roles of the I κ B kinase α and β subunits in liberating nuclear factor κ B (NF- κ B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem.* 277: 3863-3869

155. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, d. A., Birrer, M. and Karin M. (1991): Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serine 63 and 73. *Nature* 354: 494-496
156. Spehlmann, M. E. and Eckmann L.(2009): Nuclear factor- κ B in intestinal protection and destruction. *Current Opinion in Gastroenterology* 25 (2): 92-99
157. Steel, G. G. (1968): Cell loss from experimental tumors. *Cell Tissue Kinet.* 1: 193-207
158. Steinbrecher, K. A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R. and Baldwin, A. S. (2008): Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol.* 180 (4): 2588-2599
159. Sugiyama, T., Osaka, N., Koami, K., Maeda, S., Ueda, N. (2002): 7, 12-DMBA-induced rat leukemia: a review with insights into future research. *Leukemia Research* 26: 1053-1068
160. Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W. and Greene, W. C. (1993): NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 259: 1912-1915
161. Surh, Y.J., Park, K. K., Chun, K. S., Lee, L. J., Lee, E. and Lee, S. (1999): Anti-tumor-promoting activities of selected pungent phenolic substances present in ginger. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 18: 131-139
162. Suzuki, R., Kohno H., Sugie, S. and Tanaka, T. (2004): Sequential observations on the occurrence of preneoplastic and neoplastic lesions in mouse colon treated with aroxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 95 (9): 721-27
163. Svetek, J., Schara, M., Pecar, S., Hergenhausen, M., Hecker, E. (1995): Spectroscopic characterization of specific phorbol ester binding to PKC-receptor sites in membranes in situ. *Carcinogenesis* 16(10): 2589-2592
164. Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N. and Akira, S. (1999): Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284: 313-316
165. Tan, P., Fuchs, S. Y., Chen, A., Wu, K., Gomez, C., Ronai, Z. and Pan, Z. Q. (1999): Recruitment of a ROC1-CUL1 ubiquitin ligase by Skp1 and HOS to catalyze the ubiquitination of I κ B α . *Mol Cell* 3: 527-533

166. Tanaka, M. , Fuentes, M.E. , Yamaguchi, K. , Durnin, M.H. , Dalrymple, S.A. , Hardy, K.L. and Goeddel, D.V. (1999): Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice. *Immunity* 10(4): 421-29.
167. Taniguchi, S. (1993): Role of antioxidants in Tumor promotion of mouse skin. *Journal of Osaka City Medical Center* 42: 73-96
168. Tang, F., Tang, G., Xiang, J., Qing D., Rosner, M. R. and Lin, A. (2002): The absence of NF- κ B-mediated Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase activation contributes to TNF α -induced apoptosis”, *Mol Cell Biol.*: 8571-8579
169. Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M. and Lin, A. (2001): Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes, *Nature* 414: 313-317
170. Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T. and Tekeda, J. (1997): Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7400-7405
171. Ushikubi, F., Hirata, M. and Narumiya, S. (1995): Molecular biology of prostanoid receptors: an overview. *J Lipid Med Cell Signall* 12: 343-359
172. Van Duuren B.L. and Sivak, A. (1968): Tumor-promoting agents from croton tiglium L. and their mode of action. *Cancer Res.* 28(11): 2349-2356
173. Van Duuren B.L., Sivak, A., Segal, A., Seidman, I. and Katz, C. (1973): Dose-response studies with a pure tumor-promoting agent, phorbol myristate acetate. *Cancer Res.* 33: 2166-2172
174. Van Hogerlinden, M., Rozell BL, Ahrlund-Richter L. and Toftgard R. (1999): Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor- κ B signaling. *Cancer Res.* 59: 3299-3303
175. Vandermeeren, M., Janssens, S., Borgers, M. and Geysen, J. (1997): Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin VCAM-1 and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 234:19-23
176. Vekatraman, A., Ramakrishna, B.S., Pulimood, A.B., Patra, S. and Murthy, S. (2000): Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand J Gastroenterol* 35 (10): 1053-1059

177. Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., Van Antwerp, D. and Miyamaoto, S. (1995): Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* 9: 2723-2735
178. Veterinärmedizinische Pharmakologie. Veterinärpharmakologisches Institut der Universität Bern, Mevissen, M., Scholtysik G. and Denac, H., Universität Bern (2000)
179. Vogt, P.K. and Bos, T.J. (1990): Jun: Oncogene and transcription. *Adv Cancer Res* 55: 1-35
180. Wachsman, J.T. (1996): The beneficial effects of dietary restriction: reduced oxidative damage and enhanced apoptosis. *Mutation Research* 350(1): 25-34
181. Wang, Q.J., Fang, T.W., Fenick, D., Garfield, S., Bienfait, B., Marquez, V.E. and Blumberg, P.M. (2000): The lipophilicity of phorbol esters as a critical factor in determining the pattern of translocation of protein kinase C delta fused to green fluorescent protein. *J Biol Chem.* 275: 12136-12146
182. Wang, H., Birkenbach, M. and Hart, J. (2000): Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 21 (7): 1313-1317
183. Waterfield M. R., Zhang, M., Norman, L. P., Sun, S. C. (2003): NF-kappa B1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 Kinase. *Mol Cell* 11: 685-694
184. Wei, H., Wei, L., Fenkel, K., Bowen, R. and Barnes, S. (1993): Inhibition of tumorpromoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20(1): 1-12
185. Weinberg, R.A. (1996): How cancer arises. *Sci Am* 275 (3): 62-70
186. Weitzmann, S.A., Weitzberg, A.B., Clark, E.P. and Stossel, T.P. (1985): Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227: 1231-1233
187. Wolfle, D. and Marquardt, H. (1996): Antioxidants inhibit the enhancement of malignant cell transformation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis* 17: 1273-1278
188. Xiao, G., Harhaj, E. W. and Sun, S. C. (2001): NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell* 7: 401-409

189. Xue, W., Meylan, E., Oliver, T. O., Feldser, D. M., Winslow, M. M., Bronson, R., Jacks, T. (2011): Response and resistance to NF- κ B inhibitors in mouse models of lung adenocarcinoma, *Cancer Discov.* 1(3): 236-247
190. Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. and Yamamoto, S. (1995): Transcriptional roles of nuclear factor- κ B and nuclear factor interleukin-6 in tumor necrosis factor- α -dependent induction of COX-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 270: 31315-31320
191. Yamaoka, S., Courtios, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J. and Israel, A. (1998): Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 93: 1231-1240
192. Yaron, M., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A. M., Andersen, J. S., Mann, M., Mercurio, F. and Ben-Neriah, Y. (1998): Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 396: 590-594
193. Yoon, H.L., Marcus, C. B., Pfeifer, R. W. (1993): Induction of superoxide by 12-O-tetradecanoyl-13-acetate and thapsigargin, a non-phorbol-ester-type tumor promoter, in peritoneal macrophages elicited from Sencar and B6C3F1 mice: a permissive role for the arachidonic acid cascade in signal transduction. *Mol Carcinog* 7: 116-125
194. Zandi, E., Chen, Y. and Karin, M. (1998): Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science* 281: 1360-1363
195. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997): The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91: 243-252
196. Zhang, G. and Ghosh, S. (2001): Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* 107: 13-19
197. Zhao, J., Wang, J., Chen, Y. and Agarwal, R. (1999): Anti-tumor-promoting activity of a phenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 20(9): 1737-1745

7 Veröffentlichungen aus der Arbeit

Die Daten dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden weder bei internen/externen Kongressen vorgestellt, noch Teile davon wurden publiziert.

.

8 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AP-1	Aktivatorprotein-1
ATF	activating transcription factor
bp	base pairs (Basenpaare)
bZIP	basic region leucin zipper
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
COX	Cyclooxygenase
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]-anthrazen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HE	Hämatoxylin und Eosin
IAPs	anti-Apoptose Proteine (inhibitor of apoptosis)
IκB	Inhibitory κ B
IKK	I κ B Kinase
IKKAP1	IKK-associated protein 1
IKKK	I κ B Kinase Kinase Kinase
IL	Interleukin
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
min	Minuten
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NES	Nuclear Export Sequence
NF-κB	Nuklear Faktor κ B
NTPs	Nukleotidtriphosphate
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI(4,5)P₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate

RIP	receptor interacting proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Stunden
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetradecanoyl-12,13-phorbolacetat
TRADD	TNF- associated-death-domain-protein
TRAF2	TNF-receptor-associated-factor 2
TRE	TPA response elements - Abschnitte

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Darstellung des klassischen NF- κ B – Signaltransduktionsweges.....	11
Abbildung 1.2: Das Maushautmodell der Mehrstufenkarzinogenese (nach Beerenblum 1941, verändert)	18
Abbildung 1.3: Mehrstufiger Karzinogeneseprozess in menschlichen epithelialen Gewebe (nach Grafström)	18
Abbildung 1.4: Charakterisierung von Initiation und Tumorpromotion (nach Boutwell 1964, verändert)	21
Abbildung 1.5 : 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen	22
Abbildung 1.6 : Tetradecanoyl-12,13-phorbolazetat/Phorbol-12-myristat-13-azetat.	23
Abbildung 3.1: Aufbau der Versuchsreihen A-C, Applikation mit TPA erfolgte 2x pro Woche.....	45
Abbildung 3.2: Transgene Maus (Linie: $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), Wunde, entzündete Haut, 29 Wochen mit TPA behandelt.....	46
Abbildung 3.3: Transgene Maus (Linie: $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), Entzündung der Haut, Fellausfall, 15 Wochen nach Ende der TPA-Behandlung.....	46
Abbildung 3.4: Zusammenfassung Versuchsreihe A 1, Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$	47
Abbildung 3.5: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papel, 21, Woche der TPA- Behandlung	48
Abbildung 3.6: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papel, 14 Wochen nach letztmaliger TPA-Behandlung	48
Abbildung 3.7: Zusammenfassung Versuchsreihe A 2, Mauslinie C57BL/6	49
Abbildung 3.8: Ergebnisvergleich von VR A 1 und A 2.....	49
Abbildung 3.9: Zusammenfassung Versuchsreihe B 1 , Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$	50
Abbildung 3.10: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Knoten, 20 Wochen nach letztmaliger TPA-Auftragung	51
Abbildung 3.11: Zusammenfassung Versuchsreihe B 2 , Mauslinie C57BL/6	51
Abbildung 3.12: Ergebnisvergleich von VR B 1 und B 2.....	52
Abbildung 3.13: transgene Maus (Linie: $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), mit Azeton behandelte Maus, nach 3 wöchiger Behandlung	53
Abbildung 3.14: Zusammenfassung Versuchsreihe C 1 , Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$	53
Abbildung 3.15: Zusammenfassung Versuchsreihe C 2 , Mauslinie C57BL/6	54
Abbildung 3.16: Ergebnisvergleich von VR C 1 und C 2	54

Abbildung 3.17: erstmalige Tumorentstehung bei der zweimaligen Auftragung des Tumorpromotors TPA pro Woche, Vergleich von Linie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ} und Linie C57BL/6	56
Abbildung 3.18: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ} bei zweimaliger Applikation mit TPA pro Woche	56
Abbildung 3.19: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ} bei zweimaliger Applikation mit Azeton pro Woche	57
Abbildung 3.20: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei zweimaliger Applikation mit TPA pro Woche.	57
Abbildung 3.21: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei zweimaliger Applikation pro Woche mit Azeton	57
Abbildung 3.22 Aufbau der Versuchsreihen X1-4, Applikation mit TPA erfolgte 3x pro Woche	58
Abbildung 3.23: transgene Maus (Linie: <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}), Papel, 20 Wochen nach Start der TPA- Behandlung	58
Abbildung 3.24: Zusammenfassung Versuchsreihe X 1 ₁ , Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	59
Abbildung 3.25: Zusammenfassung Versuchsreihe X 3 ₁ , Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	59
Abbildung 3.26: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), TPA-behandelt, wunde, entzündete Haut, 16. Woche der TPA-Behandlung	60
Abbildung 3.27: Zusammenfassung Versuchsreihe X 1 ₂ , Mauslinie C57BL/6	60
Abbildung 3.28: Zusammenfassung Versuchsreihe X 3 ₂ , Mauslinie C57BL/6	61
Abbildung 3.29: Ergebnisvergleich von VR X 1 ₁ und X 1 ₂ und VR X 3 ₁ und X 3 ₂ .	61
Abbildung 3.30: Transgene Maus (Linie: <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}), verkrustete Hautoberfläche, 3 Wochen nach Ende der TPA-Behandlung	62
Abbildung 3.31: Transgene Maus	62
Abbildung 3.32: Zusammenfassung Versuchsreihe X 2 ₁ , Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	62
Abbildung 3.33: Zusammenfassung Versuchsreihe X 4 ₁ , Mauslinie <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	63
Abbildung 3.34: Wildtyp-Maus (Linie: C57BL/6), Papel, 5 Wochen nach der letzten TPA-Behandlung	63
Abbildung 3.35: Zusammenfassung Versuchsreihe X 2 ₂ , Mauslinie C57BL/6	64
Abbildung 3.36: Zusammenfassung Versuchsreihe X 4 ₂ , Mauslinie C57BL/6	64
Abbildung 3.37 Ergebnisvergleich von VR X 2 ₁ und X 2 ₂	65
Abbildung 3.38 Ergebnisvergleich von VR X 4 ₁ und X 4 ₂	65

Abbildung 3.39: erstmalige Tumorentstehung bei der dreimaligen Auftragung des Tumorpromotors TPA pro Woche, Vergleich von Linie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$ und Linie C57BL/6	66
Abbildung 3.40: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$ bei dreimaliger Applikation pro Woche mit TPA	67
Abbildung 3.41: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$ bei dreimaliger Applikation pro Woche mit Azeton	67
Abbildung 3.42: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei dreimaliger Applikation pro Woche mit TPA	67
Abbildung 3.43: Übersicht über Todesfälle der Versuchsreihen (VR) mit der Mauslinie C57BL/6 bei dreimaliger Applikation pro Woche mit Azeton	67
Abbildung 3.44: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe B 1, ($ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), pro Woche, \varnothing steht f. Durchmesser des Tumors in cm	69
Abbildung 3.45: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe B 2, (C57BL/6), pro Woche, \varnothing steht f. Durchmesser des Tumors in cm	70
Abbildung 3.46: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: B 1), $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$...	71
Abbildung 3.47: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: B 2), C57BL/6	71
Abbildung 3.48: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: B 1), $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$, \varnothing steht für Durchmesser des Tumors in cm	72
Abbildung 3.49: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: B 2), C57BL/6, \varnothing steht für Durchmesser des Tumors in cm	72
Abbildung 3.50: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 2 1, ($ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$), pro Woche, \varnothing steht f. Durchmesser des Tumors in cm	74
Abbildung 3.51: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 2 2, (C57BL/6), pro Woche, \varnothing steht f. Durchmesser des Tumors in cm	75
Abbildung 3.52: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 2 1), $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$ (Maus scheidet während des Versuches aus)	76
Abbildung 3.53: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 2 1), $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$	76
Abbildung 3.54: Anzahl der Tumore pro Maus (VR: X 2 2), C57BL/6	77
Abbildung 3.55: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 2 1), $ReIA^{k5\Delta/k5\Delta}$, \varnothing steht für Durchmesser des Tumors in cm	77
Abbildung 3.56: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 2 2), C57BL/6, \varnothing steht für Durchmesser des Tumors in cm	78

Abbildung 3.57: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 3 ₁ , (<i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors in cm	78
Abbildung 3.58: Anzahl und Durchmesser der Tumore der Versuchsreihe X 3 ₂ , (C57BL/6), pro Woche, Ø steht f. Durchmesser des Tumors im cm	79
Abbildung 3.59: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 3 ₁), <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}	79
Abbildung 3.60: Anzahl der Tumore pro Woche einer Maus (VR: X 3 ₂), C57BL/6..	80
Abbildung 3.61: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 3 ₁), <i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ} , Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm	80
Abbildung 3.62: Größenentwicklung eines Tumors im Verlauf des Versuches (VR: X 3 ₂), C57BL/6 Ø steht für Durchmesser des Tumors in cm	80
Abbildung 3.63: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	82
Abbildung 3.64: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	83
Abbildung 3.65: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	84
Abbildung 3.66: links: Knockout-Maus (<i>RelA</i> ^{k5Δ/k5Δ}), rechts: Wildtyp-Maus (C57BL/6), beide haben Tumor auf dem Rücken	85
Abbildung 3.67: Wildtypmaus (C57BL/6), behandelt mit dem Kontrollreagens Azeton	85
Abbildung 3.68: Epidermisspezifische Inaktivierung von <i>RelA</i> erfolgte durch das K5- cre-Transgen (Abb. links und Mitte). Die Genotypisierung mittels PCR zeigte eine gewebespezifische Deletion von <i>RelA</i> in der Haut, speziell in den Keratinocyten (mittleres und rechtes Bild)	86
Abbildung 3.69: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	87
Abbildung 3.70: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	88
Abbildung 3.71: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	90
Abbildung 3.72: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	92
Abbildung 3.73: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	93
Abbildung 3.74: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	94
Abbildung 3.75: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	95
Abbildung 3.76: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	96
Abbildung 3.77: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	97
Abbildung 3.78: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	98
Abbildung 3.79: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	99
Abbildung 3.80: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	100
Abbildung 3.81: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	101

Abbildung 3.82: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	102
Abbildung 3.83: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	103
Abbildung 3.84: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	104
Abbildung 3.85: Immunhistochemische Färbung und HE-Färbung	105
Abbildung 3.86: Immunhistochemische "Färbung" und HE-Färbung.....	106

10 Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. G. Plewig und
Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München durchführen zu können.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rudolf A. Rupec möchte ich mich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Vergabe dieses spannenden Dissertationsthemas bedanken, sowie für die Betreuung, stetige Unterstützung und Hilfestellung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich, die Möglichkeit erhalten zu haben, den praktischen und theoretischen Teil der Doktorarbeit flexibel gestalten zu können.

Herrn Dr. Michael J. Flaig aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München für die hilfreiche Unterstützung bei der Begutachtung der histologischen Präparate.

Frau Birgit Eckelt (†) möchte ich einen großen Dank für die tatkräftige Unterstützung und für die Einweisung in verschiedene Arbeitsmethoden im Labor aussprechen. Danke auch für die warme und humorvolle Atmosphäre, die meine Zeit als Doktorandin unvergessen macht. Wir vermissen dich alle.

Einen herzlichen Dank an das Histologieteam der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Herrn Harraßer und seinem Team danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Paraffinschnitte.

Frau Ursula Puchta und Silke Hill für die Einweisung und Hilfestellung in der Durchführung von histologischen und immunhistochemischen Verfahren und natürlich auch für die nette und unterhaltsame Atmosphäre im Labor.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern aus dem 7. Stock für ihre Hilfsbereitschaft und die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken, sowie für das angenehme und oft humorvolle Arbeitsklima im Labor.

Herrn Krause für die tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung der Fotos der histologischen Schnitte.

Meiner Familie, meinen Freunden und denen, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, danke ich für die zahlreiche Hilfe und moralische Unterstützung.

Marlen, dir ein riesengroßer Dank für die Hilfe bei der kreativen Gestaltung und Formatierung dieser Arbeit.

Letztendlich gilt mein allergrößter Dank meinen Eltern für die unermüdliche Unterstützung und dass ihr mir immer den Rücken frei gehalten habt in dieser oft stressigen Zeit.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei der Entstehung von
spinozellulären Karzinomen der Haut“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder
in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen
Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand